ACTH: GEWINNUNG VON ANTISEREN UND RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG

MICHAELA MADLER

1979

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR Dr. E. BUCHBORN

ACTH: GEWINNUNG VON ANTISEREN UND RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
Michaela Madler
aus Eggenfelden

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. P. C. Scriba
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Januar 1979

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. med. P. C. Scriba für die Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung und Förderung, die er mir und dieser Arbeit gewährte.

Herrn Dr. med. O. A. Müller danke ich für die ständige Betreuung und Beratung während der gesamten Versuche, sowie für die beim Verfassen der Arbeit gewährte Hilfe.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn M. V. Sofroniew für die erfreuliche Zusammenarbeit bei der Gewinnung von ACTH-Antiseren sowie bei Fräulein C.Uhlig für die technische Assistenz bei einigen Versuchen herzlich bedanken.

Frau Wiktorim danke ich für die sorgfältige Anfertigung der Zeichnungen, Fräulein F. Haag für das Ausführen der photographischen Arbeiten.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547005_0024

M E I N E N E L T E R N

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODEN	5
2.1.	Verwendete Puffer und Reagenzien	5
2.2.	Radioaktive Markierung	10
2.2.1.	Prinzip	10
2.2.2.	Markierungsvorgang	10
2.2.3.	Reinigung und Nachreinigung des Tracers	11
2.2.4.	Überprüfung der Qualität des Tracers	13
2.3.	Immunisierung	14
2.3.1.	Prinzip der Immunisierung	15
2.3.2.	Koppelung von ACTH an Thyreoglobulin	16
2.3.3.	Applikation der Antigenlösung	18
2.3.4.	Blutentnahmen und Aufbewahrung der Antiseren	19
2.3.5.	Zeitplan von Erstimmunisierung, Boosterungen und Blutentnahmen	20
2.3.6.	Ermittlung des Ak-Titers	22
2.4.	Extraktion und Radioimmunoassay	23
2.4.1.	Prinzip des RIA	23
2.4.2.	Blutentnahme und Aufbewahrung der Patientenseren	24
2.4.3.	Gewinnung von ACTH-freiem Normalserum	25
2.4.4.	Extraktion	25

Seite

2.4.4.1.	Prinzip	25
2.4.4.2.	Methode	26
2.4.5.	Einengen der Proben und Wiederaufnahme im Puffer	27
2.4.6.	Pipettier- und Inkubationsschema	28
2.4.7.	Verdünnung der im RIA eingesetzten Präparate und Reagenzien	29
2.4.7.1.	ACTH-Standard	29
2.4.7.2.	Antiserum	30
2.4.7.3.	Tracer	31
2.4.7.4.	Kaninchen-γ-Globulin	32
2.4.7.5.	2. Antikörper	33
2.4.8.	Trennung der Proben	33
2.4.9.	Zählen der Proben	34
2.4.10.	Auswertung der Versuche	34
3.	ERGEBNISSE	36
3.1.	Vorversuche	36
3.1.1.	Radioaktive Markierung	36
3.1.1.1.	Einfluß der spezifischen Aktivität des Tracers auf den Verlauf der Eichkurven	36
3.1.1.2.	Versuch zur Aufbewahrung und Nachreinigung des Tracers	40
3.1.2.	Radioimmunoassay	44
3.1.2.1.	Ermittlung der optimalen Verdünnung des Antiserums	44
3.1.2.2.	Austesten der Verdünnung des 2. Antikörpers	49

Seite

3.1.2.3.	Austesten der Inkubations-bedingungen	51
3.1.2.3.1.	Vorinkubation / Tracerinkubation	51
3.1.2.3.2.	Inkubation des 2. Antikörpers	56
3.1.3.	Entwicklung eines Extraktions-verfahrens mittels Säulen-chromatographie	58
3.1.2.3.1.	Ermittlung eines geeigneten Extraktionspuffers	60
3.1.3.2.	Austesten einer geeigneten Salzsäurekonzentration	62
3.1.3.3.	ACTH-Wiederfindung in Abhängig-keit vom pH-Wert der Extraktion	63
3.1.3.4.	Austesten der erforderlichen Volumina der bei der Extraktion verwendeten Lösungen	65
3.1.3.5.	Überprüfung der Wiederverwend-barkeit der Säulen	66
3.1.4.	Anwendung des Extraktionsver-fahrens bei der radioimmunolo-gischen ACTH-Bestimmung	68
3.1.4.1.	ACTH-Verlust beim Einengen im Rotationsverdampfer	68
3.1.4.2.	Überprüfung der pH-Werte nach dem Einengen und der Wiederauf-nahme der Proben in Puffer	70
3.1.4.3.	Abhängigkeit des Eichkurvenver-laufs vom pH-Wert des Puffers	73
3.1.4.4.	Abhängigkeit des Eichkurvenver-laufs von der Molarität des verwendeten Puffers	76

Seite

3.2.	Ergebnisse	78
3.2.1.	Berechnung der spezifischen Aktivität des Tracers	78
3.2.2.	Immunisierung	79
3.2.2.1.	Verlaufsbeobachtungen der Ak-Titer während der Immunisierung	79
3.2.2.2.	Eichkurven mit den erhaltenen Antiseren	82
3.2.2.3.	Direkte ACTH-Bestimmung im Serum mit den bei der Immunisierung erhaltenen Antiseren	86
3.2.2.4.	Veränderung der Ak-Titer durch das Lyophilisieren der Antiseren	89
3.2.3.	Beurteilung der Eichkurven	90
3.2.4.	Vergleich der Eichkurven bei Verwendung verschiedener Standard-präparate	93
3.2.5.	Beurteilung der Extraktions-methode	96
3.2.6.	Anwendung des Extraktions-verfahrens im RIA	98
4.	DISKUSSION	102
5.	ZUSAMMENFASSUNG	112

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

RIA	=	Radioimmunoassay
IAC-Assay	=	ACTH-Bioassay in vitro an isolierten Nebennierenzellen nach Sayers (IAC = Isolated Adrenal Cells)
ACTH	=	Adrenocorticotropes Hormon (falls erforderlich ist die Aminosäuresequenz als Fußnote angefügt)
h-ACTH	=	Adrenocorticotropes Hormon des Menschen
^{125}J-ACTH	=	Mit ^{125}J markiertes ACTH
Ak	=	Antikörper
Tg	=	Thyreoglobulin
CDI	=	Carbodiimid
EDTA	=	Äthylendiamintetraessigsäure
HSA	=	Humanserumalbumin
BSA	=	Serumalbumin vom Rind
PTH	=	Parathormon
LVP	=	Vasopressin

1. EINLEITUNG

Da wegen der geringen Konzentration des ACTH im Serum von ca. 10 - 100 pg/ml ein chemischer Nachweis nicht möglich ist, konnte ACTH zunächst nur mit biologischen Tests bestimmt werden, wobei spezifische Wirkungen des Hormons auf die Nebenniere gemessen wurden. Zu nennen wäre hier der klassische Sayers-Test (43), bei dem aufgrund des Ascorbinsäureschwundes aus der Nebenniere der hypophysektomierten Ratte Rückschlüsse auf die ACTH-Konzentration gezogen werden. In dem von LIPSCOMB und NELSON entwickelten Bio-Assay, der in zahlreichen Modifikationen angewandt wird, wird der Corticosteronanstieg in vivo im Nebennierenvenenblut der akut hypophysektomierten Ratte nach ACTH-Applikation gemessen (14, 23, 33, 34, 38, 47). Ein weiterer, auch in unserem Labor angewandter Bioassay ist der IAC-Assay nach SAYERS et al. (44), bei dem die Corticosteronproduktion in vitro an isolierten Nebennierenzellen nach Verabreichung von ACTH bestimmt wird (2, 30). Diese zur spezifischen Messung des biologisch wirksamen ACTH geeigneten Tests weisen jedoch eine Reihe von Nachteilen auf: In der Regel handelt es sich um äußerst arbeitsintensive Methoden, bei denen jeweils nur eine geringe Probenzahl pro Assay bestimmt werden kann. Außerdem sind die Streuungen bei Mehrfachmessungen relativ groß und die Empfindlichkeit der Assays ungenügend, so daß zwar erhöhte Werte, nicht jedoch ACTH-Normalspiegel im Serum gemessen werden können (2).

Für eine spezifische, empfindliche und genauere Messung von ACTH-Serum-Konzentrationen, die von klinisch-diagnostischer Bedeutung ist, bietet sich die radioimmunologische Bestimmung, die erstmals 1960 von BERSON und YALOW (64) für das Insulin angewandt wurde, als geeignete Methode an. Es traten jedoch gerade bei der radioimmunologischen Bestimmung des ACTH zahlreiche Schwierigkeiten auf.

Als besondere Hindernisse erwiesen sich u. a. eine Adsorption des Hormons an der Wand von Reaktionsgefäßen, wobei eine ausgeprägte Affinität zu Glaswaren besteht (3, 65), das "incubation damage", d.h. eine Zerstörung des ACTH während der Inkubationszeit, und eine starke Wärmeempfindlichkeit des Hormons, wobei die Halbwertszeit bei 37°C in vitro, also im Reagenzglas, mit 1 - 2 Stunden angegeben wird (5, 27, 28, 39, 42). Diese Probleme ließen sich jedoch weitgehend erfolgreich beseitigen: Das Silikonisieren von Glasgefäßen und die Zugabe von Fremdprotein, z.B. Albumin, zum Puffer führt zu einer Verminderung der Wandadsorption des ACTH (3,65). BERSON und YALOW (3, 65) zeigten, daß durch die Zugabe von Mercaptoäthanol die Zerstörung des Hormons während der Inkubationszeit wesentlich reduziert werden kann, da Mercaptoäthanol aufgrund seiner Sulfhydrylgruppen das ACTH vor Oxidation schützt. Nach Beobachtungen mehrerer Autoren (2, 4, 5, 32, 66) verhindern Proteinaseninhibitoren, z. B. Trasylol^{R}, durch Inaktivierung proteolytischer Enzyme eine Zerstörung des ACTH im Plasma. Wegen der Wärmeempfindlichkeit des

Hormons werden entsprechende Sicherheitsvorkehrungen getroffen, z.B. wurden in unserem Labor die Serumproben bei -80°C tiefgefroren und die Testansätze während der Inkubationszeit bei 4°C aufbewahrt.

Ein weiteres wesentliches Problem bei der radioimmunologischen ACTH-Bestimmung bereitet die Gewinnung spezifischer und empfindlicher Antiseren. Wegen des geringen Molekulargewichts von ca.4500 und der steroidogenen und somit immunsuppressiven Wirkung ist die antigene Potenz des Hormons nur gering. Es wurden daher in der Literatur zahlreiche ACTH-Präparationen als Antigene vorgeschlagen, z.B. Schweine ACTH (8), gereinigtes menschliches ACTH (20), ein ACTH-Zink-Komplex (35) sowie an verschiedene Trägerproteine, z. B. an Serumalbumin, gekoppeltes ACTH (36). Nach D. N. ORTH kann man prinzipiell mit fast jeder dieser ACTH-Präparationen Antiseren erhalten; die Zahl der immunisierten Versuchstiere sei jedoch bei den meisten Methoden sehr groß, die Ausbeute an guten Antiseren dagegen gering und zum großen Teil vom Zufall abhängig (36). So mußten bei einem von D. N. ORTH beschriebenen Verfahren (Kopplung von α_{1-24} ACTH an Serumalbumin) über 200 Meerschweinchen immunisiert werden, um ein geeignetes Antiserum zu erhalten.

Eine weitere Schwierigkeit der radioimmunologischen ACTH-Bestimmung ergibt sich durch das Vorliegen von

Störfaktoren, die eine direkte Bestimmung des Hormons im Serum erschweren. Von SAYERS et al. (13,45) wurde ein "ACTH inhibitory factor", von FEHM et al. (11, 12) ein "binding factor" beschrieben. v.WERDER et al. (56, 57, 58, 59) wiesen ebenfalls eine Bindung des ACTH an Serumproteine nach, wobei allerdings bisher kein spezifisches ACTH-bindendes Protein beschrieben wurde.
Da aus diesen Gründen eine direkte ACTH-Bestimmung im Serum nicht möglich ist, wurden zahlreiche Extraktions- und Anreicherungsverfahren entwickelt, z. B. Versuche mit Oxycellulose (7, 31, 46), Amberlite (19, 61), Gelfiltration (62), Spezialglas (40), Quso G 32 und Talkum (11, 13, 37, 41, 45). Diese Methoden erbrachten jedoch für eine genaue quantitative Bestimmung zum großen Teil unbefriedigende Ergebnisse (2, 11).

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Gewinnung empfindlicher und spezifischer Antiseren gegen ACTH. Hierzu wurde synthetisches $ß_{1-23}$-Corticotropin-amid (Acethropan^{R}-S) an Rinder-Thyreoglobulin gekoppelt. Mit den erhaltenen Antiseren wurden unter Verwendung eines mit der Chloramin T-Methode markierten und mit Quso G 32 gereinigten Tracers nach dem Doppelantikörperprinzip Eichkurven erstellt. Da sich die Antiseren zur direkten ACTH-Bestimmung im Serum nicht eigneten, wurde eine Extraktion durchgeführt. Hierbei wurde ein 1975 von LIOTTA und KRIEGER (22) beschriebenes Extraktionsverfahren mit Kieselgel in modifizierter Form angewendet.

2. METHODEN

2.1. Verwendete Puffer und Reagenzien

2.1.1.*) ACTH:

1. h-$ACTH_{1-39}$, human, synth., Fa.Ciba,Basel
2. Cortocotropin-($ß_{1-23}$)-Trikosipeptidamid, Acethropan^{R}-S, synth. ($ACTH_{1-23}$), Fa. Hoechst, Frankfurt
3. Porcine-$ACTH_{1-39}$, aus Hypophysen isoliert, Fa. Ferring, Malmö;

   Porcine-$ACTH_{1-39}$ unterscheidet sich von h-$ACTH_{1-39}$ durch die Aminosäuresequenz in der Position 31 (36).

2.1.2. Bei der radioaktiven Markierung wurde verwendet:
$Na^{125}J$, Fa. Hoechst, Frankfurt
Natriummetabisulfit: trocken, Natriumpyrosulfit, $Na_2S_2O_5$, Fa. Merck, Darmstadt
Chloramin T (Trihydrat),
$C_7H_7CNNaO_2S \cdot 3H_2O$, Fa. Merck, Darmstadt
Quso G 32, Fa. Philadelphia Quarz Comp., USA, über Fa. Interchem, München

---

*) Wir danken den genannten Firmen für die Überlassung der ACTH-Präparate

Pufferlösungen:

0,5 m Phosphatpuffer pH 7,5; Sörensen Phosphatpuffer (Puffer D)

6,81 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) werden in 100 ml Aquabidest gelöst.

44,5 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) werden in 500 ml Aquabidest gelöst.

Zur Na_2HPO_4-Lösung wird die KH_2PO_4-Lösung zugegeben, bis pH 7,5 erreicht ist.

0,015 m Na-Phosphatpuffer pH 7,4 (Puffer C)

90 g NaCl, 21 g NaH_2PO_4 x $1H_2O$ und 2 g NaN_3 werden auf 10 Liter mit Aquadest aufgefüllt und auf pH 7,4 eingestellt.

0,015 m Na-Phosphatpuffer pH 7,4; "Markierungspuffer" (Puffer B)

2,67 g Na_2HPO_4 werden nach Zugabe von 40 g Rinderserumalbumin (Fa. Roth, Karlsruhe), 400 µl 2-Mercaptoäthanol (Fa.Merck,Darmstadt) und 40 ml Trasylol^R (≙ 400 KIE/ml, Trasylol^R, 100 000 KIE/10 ml, Fa. Bayer, Leverkusen) auf 1 Liter mit Aquadest aufgefüllt und auf pH 7,4 eingestellt.

Elutionsmittel:

40 % Aceton-1 % Essigsäure

40 ml Aceton und 1 ml 100 %-Essigsäure werden mit Aquadest auf 100 ml aufgefüllt.

2.1.3. Bei der Immunisierung wurde verwendet:

Thyreoglobulin, bovine Tg, Cohn Fraktion 2, Fa. Sigma, München
Carbodiimid, 1-Ethyl-3,3-Dimethylamino-propyl-Carbodiimide-hydrochlorid, Lot 400576; Refrigerate, Fa. Calbiochem., San Diego Calif. 92112
Hydroxylamin, Fa. Sigma, München
Freund's Complete Adjuvant, Fa. Calbiochem., San Diego, Calif.
BCG-Behring-Tuberculin GT 1000, Fa. Behring, Marburg
P-Impfstoff, Pertussis Adsorbat-Impfstoff, 4 IE OKWA 02, Fa. Behring, Marburg
Liquemin 25000
25000 USP.-E. Natriumheparinat, Hoffmann La-Roche AG, Basel

2.1.4. Bei der Extraktion wurde verwendet:

0,1 m Natriumcitratpuffer pH 4,5

a) 42,02 g Citronensäuremonohydrat werden in 400 ml 1 n NaOH gelöst (A).

b) Um pH 4,5 zu erreichen, werden 74,9 Teile A mit 25,1 Teilen 0,1 n HCl vermischt.

Kieselgel S Durchmesser 0,032-0,063 mm, Chargen Nr. 528175 und 536502, Fa. Riedel de Haen, Seelze-Hannover
Silikonlösung, Fa. Serva, Heidelberg

2.1.5. Im RIA wurde verwendet:

0,5 m Phosphatpuffer pH 7,5 (Puffer D)

zur Verdünnung des Standards
(Herstellung siehe 2.1.2.)

0,05 m Veronalpuffer pH 7,7 (Puffer A)

10,31 g Na-Barbital werden mit Aquadest
auf 500 ml aufgefüllt (A).
431 ml A + 69 ml 0,1 nHCl 500 ml 0,1 m
Veronalpuffer (B).
10 g Rinderserumalbumin (Fa.Roth, Karlsruhe),
40 ml Trasylol^{R} (Fa. Bayer, Leverkusen) und
400 µl 2-Mercaptoäthanol (Fa. Merck, Darmstadt)
werden zu B zugegeben und mit Aquadest auf
1 Liter aufgefüllt.
pH-Einstellung: 7,7.

0,05 m Phosphatpuffer pH 7,4 (Puffer E)

zur Vorverdünnung des Antiserums
8,9 g Na_2HPO_4 werden mit Aquadest auf
1 Liter aufgefüllt.

Es erfolgt die Zugabe von 320 mg NaN_3 und
2,5 g Rinderserumalbumin (Fa.Roth, Karlsruhe).
pH-Einstellung 7,4.

0,015 m Na-Phosphatpuffer pH 7,4; (Markierungspuffer"

zur Verdünnung des Trancers (Herstellung
siehe 2.1.2.)

0,015 m Na-Phosphatpuffer pH 7,4 (Puffer C)

zur Verdünnung von Kaninchen-γ-Glob.
(Herstellung siehe 2.1.2.)

2. Antikörper

Anti-Rabbit-Precipitating-Serum (donkey)
for RIA, Fa. Wellcome, Beckenham, England

2.2. Radioaktive Markierung

2.2.1. Prinzip

Bei der radioaktiven Markierung wendeten wir mit geringfügigen Abänderungen die von BERSON und YALOW (63) modifizierte Methode nach HUNTER und GREENWOOD (18) an. Dabei wird radioaktives Na-Jodid durch die Zugabe von Chloramin T zu freiem Jod oxidiert und in die Tyrosinreste des ACTH - in den Positionen 2 und 23 - eingefügt. Die anschließende Zugabe von Natriummetabisulfit führt wieder zur Reduktion des überschüssigen Jods und damit zum Abbruch der Reaktion.

Nach dem Markierungsvorgang wurde der Tracer - wie von YALOW und BERSON (3, 63) beschrieben - durch eine Extraktion mit Quso G 32 gereinigt (9).

2.2.2. Markierungsvorgang

In der Regel wurden 0,5 µg h-$ACTH_{1-39}$ mit 0,5 mCi ^{125}J markiert (siehe Kap. 3.1.1.1.).
Zunächst wurde das ^{125}Jod mit 0,5 m Phosphatpuffer pH 7,5 (Puffer D) so verdünnt, daß in 20 µl Phosphatpuffer 1 mCi ^{125}J enthalten war.

Das ACTH, das mit 0,5 m Phosphatpuffer vorverdünnt in einer Konzentration von 8 µg/20 µl bei -80°C eingefroren war (siehe Kap. 2.4.7.1.), wurde mit 60 µl 0,5 m Phosphatpuffer weiterverdünnt, so daß in der Endverdünnung 1 µg ACTH in 10 µl Puffer gelöst war.

10 µl ^{125}J (≙ 0,5 mCi) und 5 µl ACTH-Lösung (≙0,5µg) wurden in ein Markierungsgefäß (10 ml-Spitzröhrchen aus Glas) pipettiert. Die Markierungsschritte nach der Zugabe des Hormons sollte man so schnell wie möglich ausführen: 25 mg Natriummetabisulfit und 25 mg Chloramin T wurden in je 8 ml 0,015 m Phosphatpuffer pH 7,4 (Puffer C) gelöst und zwar Natriummetabisulfit vor Chloramin T, da dieses leicht zerstörbar ist. Anschließend wurden dem Markierungsgefäß unter ständigem Schütteln auf einem Whirlmix 10 µl Chloramin T-Lösung (= 31 µg CT) und nach einer Markierungszeit von circa 3 sec 20 µl Natriummetabisulfit-Lösung (= 62 µg) zugegeben (9).

Um die Wandadsorption des markierten ACTH zu verhindern (3, 63), wurde 1 ml ACTH-freies Serum (siehe Kap. 2.4.3.) in das Markierungsgefäß pipettiert und der Markierungsansatz nochmals auf dem Whirlmix geschüttelt.

2.2.3. Reinigung und Nachreinigung des Tracers

Nach dem Markierungsvorgang wurde zur Abtrennung des markierten ACTH vom freien ^{125}J und ACTH-Bruchstücken eine Reinigung des Tracers mit Quso G 32 vorgenommen (3, 63). Quso besteht aus mikrofeinen, präzipitierten Silikat-Granula, die aus SiO_2-Gruppen aufgebaut sind und deren riesige Oberfläche vollständig mit Silanol-(SiOH)-Gruppen bedeckt ist. Die Granula sind nur wenig porös, besitzen aber eine sehr große Adsorptions-Kapazität. Im Gegensatz zu radioaktivem Jod und ACTH-

Bruchstücken wird das markierte ACTH an Quso adsorbiert und anschließend mit Aceton-Essigsäure wieder vom Quso eluiert. Dies wurde auch in unserem Labor durch Chromatographie auf Sephadex-Gelen überprüft und bestätigt (9).

In ein Eppendorfgefäß, das 5 mg Quso enthielt, wurde der gesamte Inhalt des Markierungsgefäßes pipettiert und in einem Whirlmix aufgeschüttelt. Danach erfolgte die Messung der "Gesamtaktivität", d. h. der Radioaktivität von freiem und hormongebundenem ^{125}Jod.
Danach wurde 1/2 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand, der das freie ^{125}J und ^{125}J-ACTH-Bruchstücke enthielt, abgesaugt. Man sollte nicht länger als 1/2 min zentrifugieren, da sich sedimentiertes Quso schlecht wieder aufschütteln läßt.

Anschließend erfolgte ein Waschvorgang mit 1 ml Aqua-dest. Das Quso wurde auf dem Whirlmix wieder aufgeschüttelt, die Lösung 1/2 min zentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt. Danach erfolgte die Messung der "Quso-Adsorption", d. h. der an Quso adsorbierten Radioaktivität, die der Aktivität des markierten ACTH entspricht.

Schließlich wurde das intakte markierte Hormon mit 300 µl eines Aceton-Wasser-Essigsäure-Gemisches (40:1:59 V/V) wieder vom Quso eluiert. Nach der Zugabe dieses Gemisches und dem Aufschütteln des Quso auf dem Whirlmix wurde 2 min in der Eppendorf-Tisch-

zentrifuge bei 3000 g zentrifugiert, und der Überstand, der das markierte eluierte ACTH enthielt, in 10 ml 0,015 m Na-Phosphatpuffer pH 7,4 ("Markierungspuffer", Puffer B) pipettiert.

Anschließend erfolgte die Messung des "Quso-Sediments",d. h. der im Quso zurückgebliebenen Radioaktivität, die der Aktivität des markierten, nicht mehr vom Quso eluierten ACTH entspricht.

Der gereinigte Tracer wurde in Fraktionen von 1 ml aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.
Bei jeder weiteren Verwendung des Tracers erfolgte eine Nachreinigung (siehe Kap. 3.1.1.2.), die ebenfalls mit Quso G 32 durchgeführt wurde und im Prinzip der Reinigung des Tracers unmittelbar nach der Markierung entspricht. Nach der Nachreinigung wurde der Tracer jeweils mit 0,015 m Na-Phosphatpuffer pH 7,4 ("Markierungspuffer") auf die im Assay eingesetzte Gebrauchskonzentration weiterverdünnt.

2.2.4. Überprüfung der Qualität des Tracers

Nach der Markierung wurde vor der Verwendung des Tracers in einem Ansatz die Brauchbarkeit des Tracers getestet. Dabei wurde die Höhe der Bindung des Tracers an das Antiserum und die anschließende Verdrängung des Tracers durch eine hohe "kalte" ACTH-Standardkonzentration überprüft. Als weiteres Kriterium für die Qualität des Tracers wurde auch die Höhe der unspezifischen Bindung N ermittelt.

Als Dreifachwerte wurden mit 0,05 m Veronalpuffer pH 7,7 B_o-Werte, eine hohe ACTH-Standardkonzentration (z.B. 1 - 10 ng/ml), die unspezifische Bindung N und Tracer mit einer Gesamtaktivität von ca. 5000 cpm angesetzt und wie üblich (siehe Kap. 2.4.6.-9.) inkubiert, getrennt und gezählt.

Das 1. und 2. Antiserum wurden dabei in den ausgetesteten optimalen Verdünnungen (siehe Kap. 3.1.2.1. - 2.) eingesetzt. Wenn unter diesen Bedingungen circa 30 % oder mehr der eingesetzten Gesamtaktivität des Tracers an das verdünnte Antiserum gebunden wurden, der Tracer durch kaltes Hormon vom Antiserum verdrängt wurde und die unspezifische Bindung 3 % der Gesamtaktivität nicht wesentlich überschritt, war der Tracer für die Verwendung in unseren Versuchen geeignet. Anderenfalls wurde erneut markiert.

2.3. Immunisierung

Wegen des geringen Molekulargewichts von ca. 4500 und der immunsuppressiven Wirkung des ACTH ist die Ausbeute an Antiseren auch bei der Verwendung einer großen Zahl von Versuchstieren und häufigen Boosterungen im allgemeinen sehr gering. Um die antigene Wirkung des ACTH zu erhöhen, wurden daher zahlreiche Verfahren zur Koppelung des Hormons an Trägersubstanzen entwickelt (8, 20, 26, 35, 36).

Eines dieser Verfahren, nämlich die Immunisierung mit einem Corticotropin-Zink-Komplex (35), wurde

schon früher in unserem Labor durchgeführt (9). Mit dieser Methode konnte jedoch bei 12 Kaninchen kein zur radioimmunologischen ACTH-Bestimmung geeignetes Antiserum gewonnen werden.

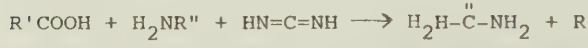
2.3.1. Prinzip der Immunisierung

Als Möglichkeit, die Antigenität niedermolekularer Substanzen zu erhöhen, hat sich die Verwendung von Thyreoglobulin (Tg) als Trägerprotein besonders bewährt (49, 50).

Thyreoglobulin, ein in der Schilddrüse synthetisiertes Glykoproteid, enthält 125 Tyrosinreste und hat ein Molekulargewicht von ca. 650 000.

CHOPRA und Mitarbeiter (6) zeigten, daß sich Tg als Immunogen zur Produktion von Antiseren gegen T_3 und T_4 ausgezeichnet eignete.
SKOWSKY und FISHER (49) bewiesen 1972, daß auch bei der Immunisierung mit anderen Hormonen - als Beispiele wurden Parathormon und Vasopressin angeführt - Tg als Carrier vielen anderen hochmolekularen Proteinen bezüglich der Ausbeute und Qualität der Antiseren weit überlegen war. Bei der Koppelung der Hormone an Tg wurde bei 100 % der immunisierten Versuchstiere ein Antiserum erhalten, bei der Verwendung anderer Trägerproteine, z. B. Rinderserumalbumin, Polylysin, Poly-Glutaminsäure usw. konnte dagegen

bei 70 Versuchstieren kein einziges geeignetes Antiserum gewonnen werden.
Zur Koppelung von ACTH an Tg eignet sich die Carbodiimid-(CDI)-Reaktion, die sich zur Koppelung von Peptiden an Trägerproteine bewährt hat (15, 21). Durch Wasserentzug bewirkt CDI (HN=C=NH) eine Koppelung zwischen aktivierten Carboxyl- und Aminogruppen:



$$R'COOH + H_2NR'' + HN{=}C{=}NH \longrightarrow H_2H{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}NH_2 + R'CONH{-}R''$$

Als Reaktionsprodukte entstehen Harnstoff und die Syntheseprodukte der Polypeptide.

In Anwesenheit von CDI könnte sich aus dem aromatischen Ring des Tyrosins O-aryl-Isoharnstoff oder N-aryl-Harnstoff bilden (49). Da ACTH in den Positionen 2 und 23 Tyrosinreste besitzt, und diese Aminosäuren am Ort der antigenen Determinante des Moleküls sitzen könnten, wird dem Reaktionsgemisch Hydroxylamin (H_2N-NH_2) zugegeben, das das überschüssige CDI abbindet und so eine Veränderung des Tyrosinrings verhindert.

2.3.2. Koppelung von ACTH an Thyreoglobulin

Wir verwendeten als Antigen Acethropan^{R}-S, ein synthetisches ACTH, das aus den ersten 23 Aminosäuren des Vollpeptids besteht. Da man beim ACTH zwischen einem biologisch aktiven N-terminalen Ende (Aminosäuren 1 - 24) und einem biologisch nicht aktiven C-terminalen Ende (Aminosäuren 25 - 39) unterscheidet, erhält man

bei der Immunisierung mit Acethropan Antiseren, die gegen den N-terminalen Anteil gerichtet sind. Damit wird auf jeden Fall das vollständige 1-39 Peptid (siehe Kap. 2.4.7.1.) erfaßt, von den Bruchstücken aber - wenn überhaupt - nur die N-terminalen, also die biologisch aktiven Anteile.

2 x 2,7 - 2,9 mg Acethropan^{R}-S wurden zusammen mit je 15 mg Tg, 450 µl Aquadest und 150 µl CDI-Lösung(23,1 mg CDI in 5 ml Aquadest) in ein Eppendorfgefäß gegeben, geschüttelt und anschließend 18 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das molare Verhältnis Acethropan : Tg : CDI betrug 60 : 1 : 112.

Es erfolgte die Zugabe von je 600 µl Hydroxylaminlösung (6,9 g Hydroxylamin in 100 ml Aquadest) und nach der Durchmischung der Substanzen eine weitere Inkubation von 6 Stunden. Die so erhaltene Lösung (insgesamt 2,4 ml) wurde zusammen mit 5 ml kompletten Freund' schen Adjuvans in einer Spritze aufgezogen und gut durchgemischt. Hierzu wurde - um die Phasentrennung aufzuheben - zwei Spritzen mit einer dazu geeigneten Kanüle verbunden und das Immunisierungsgemisch so lange von einer Spritze zur anderen gepreßt, bis die Lösung homogen und weißlich getrübt aussah. Diese Lösung wurde sofort den Kaninchen injiziert.

Der Koppelungserfolg wurde anhand eines Tracers (markiertes Acethropan^{R}-S) folgendermaßen überprüft (Versuch zusammen mit M. V. Sofroniew):

Es wurden 2 Parallelversuche angesetzt, wobei beim ersten Versuch alle oben angegebenen Reagenzien in den beschriebenen Konzentrationen inkubiert wurden. Bei dem zweiten Versuch wurden lediglich Acethropan^{R}-S und Tg in den angegebenen Konzentrationen, aber ohne die Zugabe von CDI angesetzt. Zu beiden Reaktionsansätzen wurde eine geringe Menge markiertes Acethropan^{R}-S zugegeben. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die so erhaltenen Lösungen über Sephadex-G-25-Säulen chromatographisch getrennt. Bei dem Versuch ohne die Zugabe von CDI wies die das Tg enthaltende Fraktion ca. 10 % der eingesetzten Gesamtaktivität auf, bei dem Versuch mit CDI-Zusatz enthielt die Tg-Fraktion dagegen ca. 40 % der Gesamtaktivität. Das bedeutet, daß in dem beschriebenen Konzentrationsverhältnis ca. 10 % der eingesetzten Acethropan-Menge unspezifisch an Tg gebunden und ca. 30 % chemisch, wie in Kap. 2.3.1. beschrieben, gekoppelt wird.

2.3.3. Applikation der Antigenlösung

Bei der Applikation von Antigengemischen bewährten sich nach VAITUKAITIS et al. (53) intradermale Injektionen geringer Antigenmengen an möglichst vielen Stellen des Rückens der Versuchstiere. Dadurch wird eine relativ große Zahl von Lymphbahnen und zugehörigen Lymphknoten erreicht, so daß diese Applikationsart einer einmaligen Injektion, z.B. in die Pfote der Versuchstiere, überlegen ist. Weiter wurden von VAITUKAITIS et al. (53), um die Ak-Produktion anzuregen, zusätzlich andere unspezifische Antigene, z. B. Pertussis-Impfstoff, zusammen mit dem Immunisierungsgemisch injiziert.

Mit dieser Methode wurden 12 Kaninchen (6 Albinos, 6 Wildkaninchen) immunisiert. Der Rücken der Kaninchen wurde geschoren und es erfolgten pro Immunisierung etwa 50 - 80 intradermale Injektionen, die in Bahnen am Rücken angeordnet wurden, wobei bei jeder Immunisierung neue Bahnen begonnen wurden.

Bei der Erstimmunisierung bekam jedes Kaninchen insgesamt 0,6 ml des Immunisierungsgemisches, worin etwa 0,2 mg Acethropan^{R}-S enthalten waren. Bei einigen späteren Boosterungen konnten größere Mengen injiziert werden, da einige Kaninchen bereits gestorben waren, so daß das Antigengemisch auf eine kleinere Zahl von Kaninchen verteilt werden konnte. Um die Ak-Produktion zusätzlich anzuregen, wurden den Kaninchen bei der Erstimmunisierung Pertussis-Impfstoff und Tuberculin injiziert (1,0 ml Pertussis und 1 x GT 1000 BCG-Behring verteilt auf die 12 Kaninchen). Pertussis-Impfstoff wurde auch noch bei der 1. bis zur 3. Boosterung gegeben.

2.3.4. Blutentnahmen und Aufbewahrung der Antiseren

Die Blutentnahmen erfolgten aus lateralen Ohrvenen der Kaninchen nach Hyperämisierung, die z.B. mit Xylol durchgeführt werden kann.
Das Blut wurde in Reagenzgläser gefüllt, die einige Tropfen Liquemin^{R} enthielten und 5 min bei ca. 2000 g zentrifugiert. Das Plasma wurde bei -20^{o}C eingefroren und gelagert. Später wurde ein Teil der Antiseren lyophilisiert (siehe Kap. 3.2.2.4.).

2.3.5. Zeitplan von Erstimmunisierung, Boosterungen und Blutentnahmen

Nach der Erstimmunisierung erfolgten im Abstand von jeweils 2 - 3 Wochen 3 Boosterungen. Nach einer anschließenden Immunisierungspause von 2 Monaten fanden weitere 4 Immunisierungen ebenfalls im Abstand von 2 - 3 Wochen statt. Nach einer weiteren Immunisierungspause von ca. 3 Monaten erfolgten weitere 2 Boosterungen.

Die 1. Blutentnahme erfolgte 2 Wochen, die 2. ungefähr 8 Wochen nach der 3. Boosterung. Weitere Blutentnahmen wurden nach der 5., 6. und 8. Boosterung vorgenommen, nach der 9. Boosterung wurden die überlebenden Kaninchen entblutet.

Das gesamte Immunisierungsprogramm erstreckte sich über 11 Monate.
(Zeitplan siehe Tab. 1).

Tab. 1 : Zeitplan der Boosterungen und Blutentnahmen

	Datum der Boosterungen und Zahl der immunisierten Kaninchen		Datum der Blutnentnahmen	
ERSTIMMUNISIERUNG am 31.3.1976 bei 12 Kaninchen	I.	14.April 1976 (12 Kan.)		
	II.	8. Mai 1976 (12 Kan.)		
	III.	18. Mai 1976 (12 Kan.)		
			I.	28. Mai 1976 (12 Kan.)
			II.	15. Juli (9 Kan.)
	IV.	11. Aug. 1976 (9 Kan.)		
			III.	20. Aug.1976 (9 Kan.)
	V.	24. Aug. 1976 (9 Kan.)		
			IV.	3. Sept. 1976 (5 Kan.)
	VI.	8. Sept. 1976 (9 Kan.)		
	VII.	5. Okt. 1976 (7 Kan.)		
			V.	13. Okt. 1976 (7 Kan.)
	VIII.	20. Jan. 1977 (7 Kan.)		
			VI.	1. Febr. 1977 (5 Kan.)
	IX.	22. Febr. 1977 (5 Kan.)		

Überlebende Kaninchen am 7. 3. 1977 entblutet

2.3.6. Ermittlung des Ak-Titers

Bevor die Antiseren im RIA eingesetzt wurden, wurde der Ak-Titer ermittelt.
Unter Ak-Titer verstehen wir diejenige Antiserenverdünnung, bei der ca. 30 % der Gesamtaktivität des Tracers an das Antiserum gebunden werden, wenn - wie üblich - 200 µl des verdünnten Antiserums pro Probe eingesetzt werden (siehe Kap. 2.4.6.).

Um diese Antiserum-Verdünnung zu ermitteln, wurden mit 0,05 m Veronalpuffer pH 7,7 zunächst Verdünnungsreihen der Antiseren von 1 : 1000 bis 1 : 128 000 hergestellt. Dann wurden als Dreifachwerte B_o-Werte, die unspezifische Bindung N sowie eine Tracerprobe zur Ermittlung der gesamten Aktivität des Tracers angesetzt (siehe Kap. 2.4.6.). Den B_o-Werten wurden jeweils 200 µl der verschiedenen Antiseren-Verdünnungen von 1 : 1000 bis 1 : 128 000 zugegeben. Nach einer Inkubation von circa 24 h erfolgte wie üblich (siehe Kap. 2.3.7.-9.) die Zugabe des 2. Antikörpers, eine weitere Inkubation von 1 1/2 h und das Trennen und Zählen der Proben.

Die Auswertung dieses Versuches ist in Kap. 3.1.2.1. ausführlich beschrieben.

2.4. Extraktion und Radioimmunoassay

2.4.1. Prinzip des RIA

Im RIA findet eine Konkurrenzreaktion statt zwischen einem Antigen, d.h. der zu bestimmenden Substanz, und dem radioaktiv markierten Antigen um die Bindungsstellen eines gegen das Antigen gerichteten spezifischen Antiserums.

Die Konzentration von "kaltem" Antigen stellt dabei die Variable dar, während die Konzentrationen von Antiserum und markiertem Antigen natürlich konstant gehalten werden. Die Menge an radioaktiv markiertem Antikörper-gebundenem Hormon ist der Konzentration von nicht markiertem Hormon umgekehrt proportional. Ist also wenig "kaltes" Hormon vorhanden, wird entsprechend mehr markiertes Hormon vom Antiserum gebunden und umgekehrt.

$AG + AK \longrightarrow AGAK$

$AG^* + AK \longrightarrow AG^*AK$ AG^* = markiertes Antigen

AG ist variabel
AG^* und AK sind konstant

Um die Menge an radioaktiv markiertem Antikörper-gebundenem Hormon messen zu können, ist die Abtrennung des Antikörper-gebundenen ("bound"=B) vom freien ("free"=F)Hormon notwendig. Hierzu gibt es prinzipiell

mehrere Möglichkeiten, z.B. die Adsorption von F an Charcoal oder die Fällung von B mit Polyäthylenglykol oder die Verwendung eines zweiten präzipitierenden Antikörpers, der ebenfalls die gebildeten AG-AK-Komplexe fällt. Aufgrund der Ergebnisse von EHBAUER wurde bei uns die Doppelantikörpermethode angewendet (9).

2.4.2. Blutentnahme und Aufbewahrung der Patientenseren

Wegen der circadianen Schwankungen des ACTH-Serumspiegels erfolgte die Blutentnahme bei den Patienten um 9 Uhr morgens.

Das Blut wurde in 10-ml-Polystyrol-Röhrchen gefüllt, die mit EDTA in einer Konzentration von etwa 1 mg/ml Blut beschichtet waren und jeweils 200 µl Trasylol^{R} pro 10 ml Blut (= 400 KIE/ml) enthielten.

Wegen der schnellen Inaktivierung von ACTH im Plasma (5, 27, 28, 39, 42) wurden die Röhrchen nach der Blutentnahme auf dem Transport ins Labor in einem Eisbad gekühlt. Das Blut wurde anschließend sofort zehn Minuten bei 4^{o}C und ca. 2000 g zentrifugiert und das Serum in mehreren Fraktionen von 2 - 3 ml bei -80^{o}C eingefroren.

2.4.3. Gewinnung von ACTH-freiem Normalserum

Bei der Extraktion war die Verwendung von ACTH-freiem Normalserum erforderlich. Zur Gewinnung von ACTH-freiem Normalserum wurde ein Pool aus Seren einer großen Zahl beliebiger Patienten gebildet. Da ACTH im Serum von Proteasen angegriffen wird (16, 29, 56, 60) und bei Zimmertemperatur leicht zerstörbar ist (5, 27, 28, 39, 42), wurde dieses Serum vor dem Versuch 5 - 10 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen.

2.4.4. Extraktion

2.4.4.1. Prinzip

Die Extraktion erfolgte nach einem von LIOTTA und KRIEGER (22) beschriebenen, von uns jedoch weitgehend modifizierten Verfahren (siehe Kap. 3.1.3.). Dabei wurden Kieselgelsäulen (Kieselgel S, Durchmesser 0,032 - 0,063 mm) verwendet, wobei das ACTH an Kieselgel adsorbiert und nach Spülen mit einem Puffer und Salzsäure mit Aceton-Wassergemisch wieder vom Kieselgel eluiert wurde. Zusammen mit den Serumproben wurden ACTH-Standardverdünnungen in ACTH-freiem Serum für eine Eichkurve extrahiert.

2.4.4.2. Methode

Als Säulen wurden 2 ml Plastikzylinder von Einmalspritzen (Fa. Braun, Melsungen) verwendet. Zunächst wurde pro Säule 0,5 g Kieselgel abgewogen und in 0,1 m.Natriumcitratpuffer pH 4,2 - 4,5 mindestens 1 Stunde gequellt, wobei während dieser Zeit ein mehrmaliges Aufschütteln des Gels erfolgte. Die zentrale Ausflußöffnung der Säulen wurde mit 2 Lagen einer Glasmatte verschlossen und mit Aquadest gespült, um die Entstehung von Luftblasen beim Einfüllen des Gels zu verhindern. Anschließend wurde das gequellte Kieselgel nach vorsichtigem Abgießen des überstehenden Puffers in die Säulen gefüllt. Es wurde ein Überstand von circa 1 ml Puffer über dem Gel belassen, um ein Austrocknen der Säulen zu verhindern.

Die Serumproben und das ACTH-freie Serum (siehe Kap. 2.4.3.) wurden mit 0,1 n HCl auf pH-Werte zwischen 4,2 und 4,5 eingestellt. Für die Extraktion der Eichkurve wurden im ACTH-freien Serum pH 4,2 - 4,5 Standardverdünnungen von 1025 pg/ml bis 4 pg/ml hergestellt (siehe Kap. 2.4.7.1.). Nach diesen Vorbereitungen wurden folgende Proben auf die Säulen aufgetragen:

2 x 1 ml ACTH-freies Normalserum, pH 4,2 - 4,5, (B_o-Werte), sowie jeweils 1 ml der Standardverdünnungen bzw. Serumproben. Das Auftragen der Proben erfolgte vorsichtig, um ein Aufwirbeln des Gels zu vermeiden. Nach dem Eindringen der Proben in das Gel wurden pro

Säule 2 x 1 ml 0,1 m Natriumcitratpuffer, pH 4,2 - 4,5, und anschließend 2 x 1 ml 0,2 n HCl aufgetragen. Diese Lösungen erschienen im Vorlauf und wurden verworfen. Schließlich wurde das an Kieselgel adsorbierte ACTH mit 50 %igem Aceton-Wassergemisch wieder vom Kieselgel eluiert. Hierzu wurden je 3 ml 50 %iges Aceton-Wassergemisch auf die Säulen aufgetragen und die Eluate in silikonisierten Glasröhrchen aufgefangen.

Um den durch die Extraktion bedingten ACTH-Verlust festzustellen, wurde bei jedem Versuch eine Tracerprobe (900 µl ACTH-freies Serum gemischt mit 100 µl einer Tracerverdünnung) mitgeführt, wobei die Aktivität vor und nach der Extraktion gemessen wurde.

2.4.5. Einengen der Proben und Wiederaufnahme im Puffer

Die Proben, die das eluierte ACTH in 3 ml des Aceton-Wassergemisches enthielten, konnten ohne Verluste mehrere Stunden, z. B. über Nacht, bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt werden (22).

Die Proben wurden in einem Rotationsverdampfer ca. 1 1/2 h bei Raumtemperatur und anschließend 1/2 h bei 50°C eingeengt. Bei einigen Versuchen wurde auch ein "Vortex Evaporator" mit den Einstellungen: Temperatur 20°C, Schüttler Stufe 6, eingesetzt. Bei der Verwendung des "Vortex Evaporators" dauerte das Einengen ebenfalls circa 2 h. Nach dem Einengen wurden die Proben in je 1 ml 0,05 m Veronalpuffer pH 8,0 aufgenommen und geschüttelt.

2.4.6. Pipettier- und Inkubationsschema

Die extrahierten Proben wurden zusammen mit einer nicht extrahierten Eichkurve im RIA eingesetzt, wobei pro Eichkurve in deckellosen Eppendorf-Reaktionsgefäßen folgende Proben angesetzt wurden:

Je 6 Proben zur Messung der B_o-Werte und jeweils 3 Proben der einzelnen Standardkurvenpunkte, der unspezifischen Bindung N sowie des Tracers zur Ermittlung der gesamten eingesetzten Aktivität.

Die Versuche wurden nach folgendem Pipettier- und Inkubationsschema durchgeführt:

		B_o-Werte (6x)	Standard-kurven-punkte (3x)	unspezif. Bindung (3 x)	"Gesamt aktivit (3 x
1. Tag	Puffer	300 µl	-	500 µl	-
	ACTH-Standard	-	300 µl	-	-
	Antiserum	200 µl	200 µl	-	-
	Es erfolgte eine kalte Vorinkubation von ca.24 h bei 4°C.				
2. Tag	Tracer mit Kaninchen--γ-Glob.	100 µl	100 µl	100 µl	100
	Die Inkubation nach Tracerzugabe betrug ca. 24 h bei 4°C.				

		B_o-Werte (6x)	Standard-kurven-punkte (3x)	unspezif. Bindung (3x)	"Gesamt-aktivität (3x)
3. Tag	2.Anti-körper	100 µl	100 µl	100 µl	-

Es erfolgte eine Inkubation von 1 1/2 h bei 4°C.

Zum Pipettieren des Antiserums, des Tracers und des 2. Antikörpers wurden Hamilton-Spritzen verwendet.

Wegen der Wärmeempfindlichkeit des ACTH (5, 27, 28, 39, 42) wurden die Versuche möglichst zügig durchgeführt, um ein zu langes Stehen der Proben bei Zimmertemperatur zu vermeiden.

Der Reaktionsansatz wurde während der Inkubationszeiten bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt, wobei die dekkellosen Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Parafilmfolie verschlossen wurden.

2.4.7. Verdünnung der im RIA eingesetzten Präparate und Reagenzien

2.4.7.1. ACTH-Standard

Bei den meisten Versuchen wurde als Standardpräparat h-$ACTH_{1-39}$ (Fa. CIBA) verwendet, einige Versuche wurden auch mit Porcine-ACTH (Fa. Ferring) sowie mit Acethropan^R-S (Fa. Hoechst) durchgeführt (siehe Kap. 2.1.1.).
h-$ACTH_{1-39}$ und Porcine ACTH wurden zunächst vorver-

dünnt und bei -80°C aufbewahrt. Dabei wurde 0,2 mg lyophilisiertes h-$ACTH_{1-39}$ in 500 µl 0,5 m Phosphatpuffer pH 7,5 (Puffer D) gelöst. In Portionen von 20 µl, die also 8 µg ACTH enthielten, wurde der verdünnte Standard in kleine silikonisierte Glasgefäße pipettiert, die mit Plastikfolie verschlossen und bei -80°C gelagert wurden.

Zur Herstellung von Eichkurven wurde der ACTH-Standard im allgemeinen mit 0,05 m Veronalpuffer pH 7,7 auf 1025 pg/ml weiterverdünnt und von dieser Konzentration ausgehend eine Verdünnungsreihe bei 4 pg/ml erstellt. Die Eichkurve enthielt also insgesamt 10 Punkte: 1025, 512,5, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 0 pg/ml.

2.4.7.2. Antiserum

Nach den Blutentnahmen wurden die Antiseren z.T. unverdünnt bei -20°C eingefroren, z.T. lyophilisiert aufbewahrt (siehe Kap. 3.2.2.4.).

Von den jeweils in den Versuchen eingesetzten Antiseren wurde mit 0,05 m Phosphatpuffer pH 7,5 (Puffer E) eine Stammlösung hergestellt, in der die Antiseren in einer Verdünnung von 1 : 1000 vorlagen. In dieser Lösung konnten die Antiseren mehrere Monate ohne Qualitätsverlust bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt werden. Nach Beobachtungen anderer Autoren (54) konnten Antiseren bis zu 3 Monaten ohne Abfall des Titers in einer Stammlösung bei 4°C gelagert werden. Von der

Stammlösung ausgehend wurden die Antiseren mit 0,05 m Veronalpuffer pH 7,7 bis zu der ausgetesteten optimalen Verdünnung, bei der circa 30 % der Gesamtaktivität des Tracers vom Antiserum gebunden wurden (siehe Kap. 2.3.6. und 3.1.2.1.), weiterverdünnt.

Es wurden hauptsächlich folgende Antiseren verwendet: Antiserum K_5 von der 2. Blutentnahme in einer Verdünnung von 1 : 50 000 und Antiserum K_{10} von der 3. Blutentnahme in einer Verdünnung von 1 : 64 000. Dabei wurden jeweils 200 µl der jeweiligen Antiserum-Verdünnung im RIA eingesetzt.

Bevor uns die Antiseren aus unserem eigenen Immunisierungsprogramm zur Verfügung standen, wurden Antiseren verwendet, die uns freundlicherweise aus Ulm und San Francisco überlassen worden waren. * Das Antiserum K_{12} aus Ulm wurde 1 : 7000 verdünnt eingesetzt, das Antiserum aus San Francisco in einer Verdünnung von 1 : 27 000.

2.4.7.3. Tracer

Der bei -80°C eingefrorene, relativ konzentrierte Tracer wurde vor jeder Verwendung nachgereinigt (siehe Kap. 2.1.3. und 3.1.1.2.).

---

* Für die Überlassung der Antiseren möchten wir uns sehr herzlich bei Herrn Dr. L. Fehm und Herrn Dr. K. H. Voigt (Ulm) sowie bei Herrn Dr. S. Hane (San Francisco) bedanken.

Da die Empfindlichkeit des Assays bei geringer Konzentration des markierten ACTH zunimmt und außerdem die Konzentration an Aceton-Essigsäure nur minimal sein sollte, wurde der Tracer relativ stark verdünnt eingesetzt.

Die Verdünnung erfolgte mit 0,015 m Na-Phosphatpuffer pH 7,4 (Puffer B), worin 4 % Rinderserumalbumin enthalten waren. 100 µl Tracer hatten in der Endverdünnung etwa 5000 - 6000 cpm.

2.4.7.4. Kaninchen-γ-Globulin

Da die Konzentrationen der Reaktionspartner bei der radioimmunologischen ACTH-Bestimmung sehr gering sind, muß dem Reaktionsansatz γ-Globulin zugegeben werden. Hierdurch kommt die immunologische Reaktion in Gang, so daß eine ausreichende Ag-Ak-Komplexbildung erzielt werden kann.

Kaninchen-γ-Globulin wurde mit 0,015 m Na-Phosphatpuffer pH 7,4 (Puffer C) so verdünnt, daß 7 mg γ-Globulin in 1 ml Puffer gelöst waren. Diese Vorverdünnung wurde bei -20°C eingefroren. Um einen Pipettierschritt zu sparen, wurde das Kaninchen-γ-Globulin dem Tracer zugegeben. Dabei kamen auf 10 ml Tracer in Endverdünnung 100 µl Kaninchen-γ-Globulin-Verdünnung, die 700 µg Kaninchen-γ-Globulin enthielten.

Da 100 µl Tracer im Assay eingesetzt wurden, betrug die Kaninchen-γ-Globulin-Konzentration 7 µg/Probe. Dieser Kaninchen-γ-Globulin- Zusatz erfolgte in Anlehnung an die radioimmunologische TSH-Bestimmung (10).

2.4.7.5. 2. Antikörper

Der 2. Antikörper vom Esel wurde bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt und mit 0,05 m Veronalpuffer pH 7,7 auf die jeweilige Gebrauchsverdünnung gebracht. Für jede Charge dieses Antiserums mußte die optimale Verdünnung neu ausgetestet werden (siehe Kap. 3.1.2. 2.).

2.4.8. Trennung der Proben

Nach einer Inkubationszeit des 2. Antikörpers von 1 1/2 h erfolgte die Trennung der Proben, d.h. die Abtrennung des Antikörper-gebundenen ^{125}J-ACTH von freiem ^{125}J-ACTH. Die Proben wurden in einer Kühlzentrifuge (Mistral 6L) 15 min bei 4°C und 2000 g zentrifugiert.

Dann erfolgte das Absaugen des Überstandes mit einer Wasserstrahlpumpe. Um eine größere Genauigkeit der Dreifachwerte zu erzielen, wurde zu jeder Probe 1 ml Aquadest pipettiert, was zu einer Verdünnung des in den Eppendorfgefäßen verbliebenen Überstandes führte. Es erfolgte ein weiteres Zentrifugieren der Proben von 10 min bei 4°C und 2000 g und ein erneutes Absaugen des Überstandes.

2.4.9. Zählen der Proben

Die radioaktiven Proben wurden im "gamma guard 150" (Fa. ICN Tracerlab, Köln) unter folgenden Bedingungen gezählt:

Coarse gain 64; fine gain 1,4; window 2,3.
Die Zählzeit betrug in der Regel 2 Minuten.

2.4.10. Auswertung der Versuche

Die Eichkurven wurden mit Hilfe einer EDV-Anlage mittels Spline-Funktion ausgewertet. Dabei wird durch ein mathematisches Verfahren ein möglichst stetiger und glatter Kurvenzug aus den experimentellen Daten ermittelt (24, 25). Die Eichkurve verläuft mit einer bestimmbaren Genauigkeit in der Nähe der Eichpunkte. Durch einen Glättungsfaktor läßt sich die Genauigkeit des Kurvenverlaufs bestimmen und man hat die Möglichkeit, einen herausfallenden Meßwert zu übergehen. Die Standardkonzentrationen wurden dabei logarithmisch auf der Abszisse aufgetragen, so daß die Auswertung über eine sigmoide Kurve vorgenommen werden konnte. Hierdurch ist gegenüber einer hyperbelförmigen Kurve die Interpolationsgenauigkeit erhöht (24, 25).

Bei der mathematischen Auswertung der Versuche wurden gleichzeitg zwei Werte mit ausgedruckt, die für die Charakterisierung der Eichkurven von Bedeutung sind, nämlich die untere Nachweisgrenze und der 50-Prozent-Intercept.

Die untere Nachweisgrenze gibt die geringste ACTH-Konzentration an, die an der Eichkurve noch abgelesen werden kann.
Im 50-Prozent-Intercept wird die ACTH-Standardkonzentration angegeben, bei der noch 50 % Aktivität des B_o-Wertes gebunden werden. Dieser Zahlenwert erlaubt somit eine Aussage über die Steilheit der Eichkurve.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vorversuche

3.1.1. Radioaktive Markierung

3.1.1.1. Einfluß der spezifischen Aktivität des Tracers auf den Verlauf der Eichkurven

Um den Einfluß der spezifischen Aktivität des Tracers auf den Verlauf der Eichkurven zu untersuchen, wurden unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen 3 Markierungen mit jeweils 1 mCi, 0,5 mCi und 0,25 mCi ^{125}J der gleichen Charge durchgeführt.
Aufgrund der Zahlenverhältnisse der "Quso-Adsorption", d. h. der bei der Reinigung der Tracer an Quso adsorbierten Aktivität (siehe Kap. 2.2.3.) zu der insgesamt bei der Markierung eingesetzten Aktivität errechneten sich die spezifischen Aktivitäten der Tracer zu ca. 1820, 920 und 240 mCi/mg (siehe Kap. 3.2.1.).

Um die Brauchbarkeit der Tracer zu überprüfen, wurde am Tag der Markierung die Höhe der Bindung $\frac{B_0}{T}$ und der unspezifischen Bindung N ermittelt (siehe Kap. 2.2.4.). Zwei Tage später wurden mit der üblichen Methode Eichkurven erstellt (siehe Kap. 2.4.6.-10.). Als Antiserum wurde K_{10} von der 3. Blutentnahme in einer Verdünnung von 1 : 64 000 eingesetzt. Die pro Probe eingesetzte Menge an ^{125}J-ACTH in pg wurde für die verschiedenen Tracer berechnet. Wir erhielten folgende Ergebnisse:

spez.Aktivität des Tracers: mCi/mg	Bindung $\frac{B_o}{T}$ in % der Gesamtaktivität	unspez.Bindung N in % der Gesamtaktivität	^{125}J-ACTH Menge/Prob in pg
1820	46,7	2,3	2,5
920	37,5	2,3	6
240	15,3	2,5	41,6

Die Bindung des Tracers an das Antiserum nahm mit der Abnahme der spezifischen Aktivität des Tracers und der Zunahme der eingesetzten Menge an ^{125}J-ACTH pro Probe erheblich ab. Die unspezifische Bindung blieb dagegen bei den Tracern mit verschiedener spezifischer Aktivität annähernd gleich.

Trotz der erheblichen Unterschiede in der Höhe der jeweiligen Bindung des Tracers an das Antiserum bestanden nur relativ geringfügige Unterschiede im Verlauf der 3 Eichkurven (siehe Abb. 1). Die unteren Nachweisgrenzen der 3 Kurven lagen in einem Bereich zwischen 5,27 und 5,7 pg/ml und zeigten somit eine annähernde Übereinstimmung.

Auch bezüglich der Lage der Kurven ergaben sich nur sehr geringe Unterschiede:
Den flachsten Kurvenverlauf mit einem 50-Prozent-Intercept von 73,35 pg/ml hatte die Eichkurve bei der Verwendung des Tracers mit der spezifischen Aktivität 240 mCi/mg.

Der steilste Kurvenverlauf mit einem 50-Prozent-Intercept von 56,32 pg/ml wurde mit dem Tracer der spezifischen Aktivität 920 mCi/mg erhalten. Nur geringfügig flacher verlief die Kurve, bei der der Tracer mit der spezifischen Aktivität 1820 mCi/mg eingesetzt worden war.

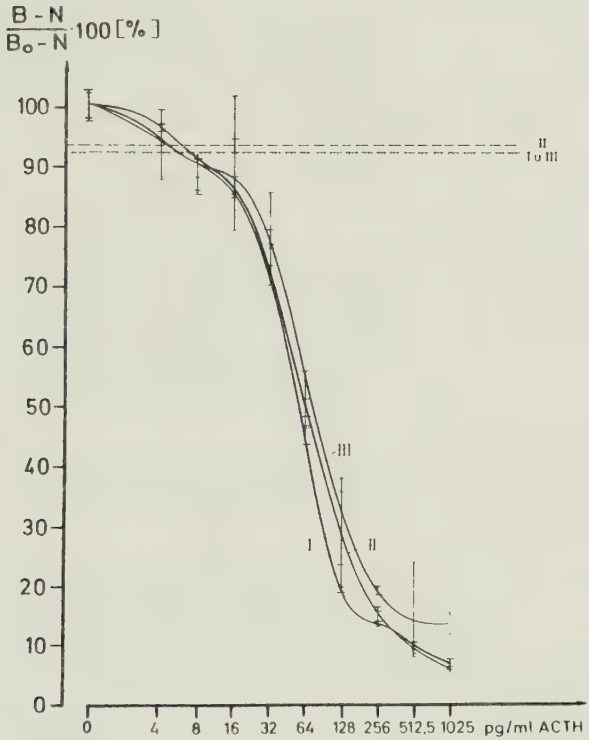


Abb. 1: Standardkurven mit ^{125}J-ACTH mit verschiedener spezifischer Aktivität

Spezifische Aktivitäten: Kurve I : 920 mCi/mg
Kurve II :1820 mCi/mg
Kurve III : 240 mCi/mg

Antiserum: K_{10} vor der 3. Blutentnahme

Ak-Titer: 1 : 64 000

Insgesamt stellten wir fest, daß Änderungen der spezifischen Aktivität des Tracers in dem untersuchten Bereich nur geringe Auswirkungen auf die Empfindlichkeit und Steilheit der zugehörigen Standardkurven zur Folge hatten.

Die Höhe der Bindung $\frac{B_o}{T}$ nahm jedoch - im Gegensatz zu den Ergebnissen beim TSH-Tracer (10) - mit abnehmender Markierung ab. Auch wurde eine Verbesserung der Standardkurven durch die Verwendung niedrig markierter Tracer von uns nicht festgestellt. Aus praktischen Gründen wurden alle weiteren Markierungen mit 0,5 mCi ^{125}Jod durchgeführt.

3.1.1.2. Versuch zur Aufbewahrung und Nachreinigung des Tracers

Bei Untersuchungen an TSH-Tracer fanden ERHARDT et al. (10), daß die Zersetzungsreaktion des Tracers, d. h. die Abspaltung von Jodid, u.a. von der Konzentration abhängig ist, wobei die Aufbewahrung von konzentrierten Tracern zu einer schnelleren Zunahme des Jodidanteils gegenüber dem hormongebundenen Jod führte. Daher wurde eine höhere Bindung $\frac{B_o}{T}$ und eine niedrigere unspezifische Bindung N erhalten, wenn die Tracer unmittelbar nach der Markierung auf die im Assay eingesetzte Gebrauchskonzentration verdünnt und eingefroren wurden.

Im folgenden Versuch wurde dies für ACTH-Tracer überprüft. Es wurde dabei auch untersucht, ob eine Verdünnung des Tracers auf die Gebrauchskonzentration nach der Markierung und spätere Verwendung ohne Nachreinigung oder die Aufbewahrung des konzentrierten Tracers mit einer Nachreinigung im ACTH-RIA günstigere Ergebnisse brachte.

Dazu wurde ein Tracer mit einer spezifischen Aktivität von ca. 1800 mCi/mg hergestellt. Ein Teil des Tracers wurde konzentriert eingefroren, der Rest auf die im Assay eingesetzte Endkonzentration verdünnt und ebenfalls eingefroren.

Zehn Tage nach der Markierung wurde die Höhe der B_o-Werte und der unspezifischen Bindung N ermittelt. Dazu wurde der verdünnte Tracer ohne Nachreinigung eingesetzt und der konzentrierte Tracer einmal mit und einmal ohne Nachreinigung. Die Nachreinigung erfolgte, wie in Kap. 2.2.3. dargestellt, durch eine Extraktion mit Quso G 32. Nach weiteren 15 Tagen, d. h. 25 Tage nach der Markierung, wurde derselbe Versuch wiederholt.

Wir erhielten folgendes Ergebnis (siehe Tab. 2):

Tab. 2: Abhängigkeit der Bindung $\frac{B_o}{T}$ von der Aufbewahrungsart und Nachreinigung des Tracers

		Bindung $\frac{B_o}{T}$ in % der Gesamtaktivität	unspezif. Bindung N in % der Gesamtaktivität
Am Tag der Markierung		31,3	1,4
10 Tage nach der Markierung	A) Tracer konzentriert eingefroren, mit Quso nachgereinigt	29,4	2,2
	B) Tracer konzentriert eingefroren, nicht nachgereinigt	24,9	3,7
	C) Tracer verdünnt eingefroren, nicht nachgereinigt	26,4	2,4
25 Tage nach der Markierung	A) Tracer konzentriert eingefroren, mit Quso nachgereinigt	23,9	2,9
	B) Tracer verdünnt eingefroren, nicht nachgereinigt	11,9	8,7

In Übereinstimmung mit ERHARDT et. al. (10) fanden wir, daß ein konzentriert eingefrorener, nicht nachgereinigter Tracer bereits 10 Tage nach der Markierung eine niedrigere Bindung $\frac{B_O}{T}$ und eine höhere unspezifische Bindung N aufweist im Vergleich zu einem verdünnt eingefrorenen Tracer.

Dennoch war die Bindung $\frac{B_O}{T}$ des konzentriert eingefrorenen und vor dem Gebrauch nachgereinigten Tracers nach diesem Zeitraum um 3 % höher als die Bindung des verdünnt eingefrorenen, nicht nachgereinigten Tracers.

25 Tage nach der Markierung war dieser Unterschied noch deutlicher: Der nachgereinigte Tracer hatte einen B_O-Wert von 23,9 %; der B_O-Wert des verdünnt eingefrorenen, nicht nachgereinigten Tracers betrug dagegen nur 11,9 %.

Die unspezifische Bindung des nicht gereinigten Tracers war zu diesem Zeitpunkt dreimal so hoch wie die des nachgereinigten Tracers.
Durch einen 2. Versuch wurden diese Ergebnisse bestätigt.

Bei unseren Versuchen wurden daher alle Tracer nach der Markierung konzentriert eingefroren und vor dem jeweiligen Gebrauch nachgereinigt. Da die Reinigung des Tracers durch Extraktion mit Quso G 32 eine einfache und schnell durchführbare Methode ist (siehe Kap. 2.2.3.), konnte dadurch mit relativ geringem Zeitaufwand eine höhere Bindung des Tracers an das Antiserum erhalten werden.

ERHARDT et al. (10) zeigten bei Untersuchungen an TSH-Tracer, daß zwischen der Zersetzungsreaktion, d. h. der Abspaltung von Jodid, und der spezifischen Aktivität der Tracer eine Abhängigkeit besteht, wobei hochmarkierte Tracer relativ große Mengen Jodid in kurzer Zeit abspalten. Bei einem TSH-Tracer der spezifischen Aktivität 43 mCi/mg wurden bei gleicher Aktivität per Volumeneinheit nur 12 % Jodid in 14 Tagen abgespalten, bei einem Tracer mit der spezifischen Aktivität 220 mCi/mg dagegen 26 % (10). Die Höhe der B_o-Werte fiel daher bei dem Tracer der spezifischen Aktivität 220 mCi/mg innerhalb von 14 Tagen bei verdünnter Aufbewahrung von 27,8 auf 8,9 % ab, bei dem Tracer der spezifischen Aktivität 43 mCi /mg dagegen nur von 41,6 auf 33,8 %.

Da die von uns verwendeten ACTH-Tracer eine relativ hohe spezifische Aktivität aufweisen, wäre dies eventuell eine Erklärung für die schnelle Abspaltung von Jodid und Zunahme der unspezifischen Bindung N und für die daher bereits kurze Zeit nach der Markierung erforderliche Nachreinigung der Tracer.

3.1.2. Radioimmunoassay

3.1.2.1. Ermittlung der optimalen Verdünnung des Antiserums

Eine wesentliche Rolle für den Verlauf von Eichkurven spielt die richtige Wahl der Antikörperkonzentration. Im allgemeinen wählt man die Antiserum-Konzentration so, daß am Nullpunkt der Eichkurve, d. h. in Abwesen-

heit von kaltem Hormon, der Tracer zu etwa 50 % gebunden wird. Eine Steigerung der Meßempfindlichkeit, ausgedrückt durch die untere Nachweisgrenze, kann erreicht werden, wenn man das Antiserum so verdünnt, daß etwa nur noch 30 % oder sogar noch weniger der Gesamtaktivität des Tracers gebunden werden.

Da die ACTH-Spiegel im Serum von Normalpersonen im Bereich weniger pg/ml liegen, sollte ein ACTH-RIA möglichst empfindlich sein. Bevor die Antiseren in einem Versuch eingesetzt wurden, wurde daher die Antiserum-Verdünnung ermittelt, bei der circa 30 % der Gesamtaktivität des Tracers gebunden wurden (Versuchsdurchführung siehe Kap. 2.3.6.).

Das Ergebnis dieses Versuchs ist für das Antiserum K_5 von der 2. Blutentnahme in Abbildung 2 in einer Kurve aufgezeichnet: Auf der Ordinate wurden die Prozent Bindung bezogen auf die Gesamtaktivität, auf der Abszisse die jeweiligen Antiserum-Verdünnungen aufgetragen.

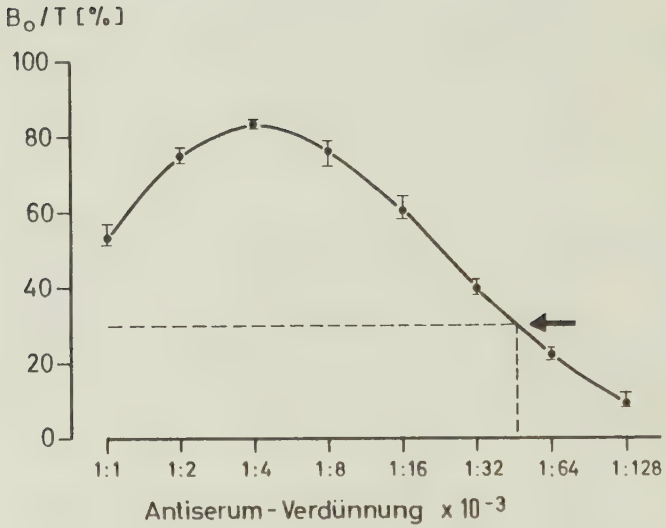


Abb. 2: Antikörper-Verdünnungs-Kurve

mit dem Antiserum K_5 von der 2. Blutentnahme. Bei einer Antiserumverdünnung von ca. 1 : 50 000 werden 30 % der Gesamtaktivität des Tracers gebunden.

Die Kurve weist ein Maximum auf, weil der 2. Antikörper für niedrige Konzentrationen an 1. Antikörper ausgetestet wurde, so daß bei zu hohen Konzentrationen des 1. Antiserums - aus rein methodischen Gründen - eine relativ zu niedrige Bindung erreicht wird. Die Antiserum-Verdünnung, bei der circa 30 % der Gesamtaktivität gebunden werden, ist die im allgemeinen eingesetzte "optimale" Verdünnung. Beim Antiserum K_5 war dies eine Verdünnung von ca.1:50000.

Um zu überprüfen, ob eventuell mit noch geringeren Antiserum-Konzentrationen empfindlichere Eichkurven erhalten werden könnten, wurde folgender Versuch durchgeführt:

Mit einem Antiserum (das uns aus San Francisco zur Verfügung gestellt worden war), wurde wie oben beschrieben, eine Ak-Verdünnungskurve hergestellt. Bei einer Verdünnung des Antiserums von circa 1 : 28 000 wurden 30 % der Gesamtaktivität des Tracers gebunden. Hierauf wurden 4 Eichkurven erstellt, wobei das Antiserum in den Verdünnungen 1 : 16 000, 1 : 24 000, 1 : 32 000 und 1 : 38 000 eingesetzt wurde. Dies entsprach auf der Ak-Verdünndungskurve einer Bindung $\frac{B_0}{T}$ von circa 41 %, 33 %, 26 % und 22 % der Gesamtaktivität des Tracers.

Die Versuche wurden unter sonst gleichen Versuchsbedingungen mit der üblichen Methode durchgeführt:
Bei der geringsten Antiserum-Verdünnung von 1 : 16 000

wurde eine Eichkurve mit einer unteren Nachweisgrenze von 27,2 pg/ml und einem 50-Prozent-Intercept von 92,5 pg/ml erhalten.

Mit einer Antiserum-Verdünnung von 1 : 24 000 wurde die steilste und empfindlichste Eichkurve mit einer unteren Nachweisgrenze von 2,5 pg/ml und einem 50-Prozent-Intercept von 50,2 pg/ml erzielt.

Nur geringfügig flacher verliegen die Eichkurven, bei denen das Antiserum noch stärker verdünnt worden war. Die unteren Nachweisgrenzen der beiden Kurven lagen jedoch höher. Sie betrugen 7,9 pg/ml bei einer Verdünnung des Antiserums von 1 : 32 000, bzw. 15,6 pg/ml bei einer Verdünnung des Antiserums von 1 : 38 000.

Da die Höhe der B_o-Werte von mehreren Faktoren - insbesondere auch von der Qualität des Tracers - abhängig ist, kann die Höhe der B_o-Werte bei gleicher Antiserum-Konzentration und annähernd gleicher Countzahl des Tracers bei verschiedenen Versuchen in gewissen Bereichen schwanken. Beim oben beschriebenen Versuch wurden insgesamt bei gleicher Antiserum-Konzentration niedrigere B_o-Werte als bei der vorher durchgeführten Ak-Verdünnungskurve erhalten. Die empfindlichste Eichkurve wurde daher bei diesem Versuch bei einer Ak-Tracerbindung von circa 25 % erhalten, während die Kurven mit B_o-Werten von circa 32 %, 23 % und 20 % der Gesamtaktivität weniger empfindlich waren.

Aus den oben dargestellten Gründen - Abhängigkeit der Höhe der B_o-Werte vom Tracer, den Inkubationszeiten usw. - kann das Ergebnis eines einzigen Versuches nicht für alle weiteren Versuche verallgemeinert werden. Man könnte jedoch den Schluß ziehen, daß ein gewisses - offensichtlich relativ eng begrenztes - "Verdünnungsoptimum" des Antiserums besteht, wobei sowohl niedrigere als auch höhere Konzentrationen zu einer Verminderung der Empfindlichkeit der Eichkurven führen. Diese optimale Verdünnung scheint im allgemeinen - wie eingangs bereits beschrieben und sich auch bei unseren Antiseren bewährte - in einem Bereich zu liegen, in dem circa 30 % der Gesamtaktivität des Tracers gebunden werden.

3.1.2.2. Austesten der Verdünnung des 2. Antikörpers

Als 2. Antikörper wurde Anti-Kaninchen-γ-Globulin vom Esel verwendet, wobei für jede Charge die optimale Verdünnung neu ausgetestet werden mußte.

Hierzu wurden B_o-Werte erstellt, wobei der 2. Antikörper in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und anschließend festgestellt wurde, bei welcher Konzentration des 2. Antikörpers die höchste Bindung erreicht wurde. Dieser Versuch sei an einem Beispiel ausführlich beschrieben:

Als Dreifachwerte wurden 8 B_o-Werte angesetzt und circa 24 h inkubiert. Als Antiserum wurde K_{10} von der 3. Blutentnahme in einer Verdünnung von 1:64000 eingesetzt. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl des 2. Antikörpers in den folgenden Verdünnungen: 1 : 6, 1 : 8, 1 : 10, 1 : 12, 1 : 16, 1 : 20, 1 : 24 und 1 : 32. Nach einer weiteren Inkubation voncirca 1 1/2 h wurden die Proben getrennt und gezählt. Die erhaltene Tracerbindung wurde - bezogen auf die jeweilige Verdünnung des 2. Antikörpers - in einer Kurve aufgezeichnet (siehe Abb. 3).

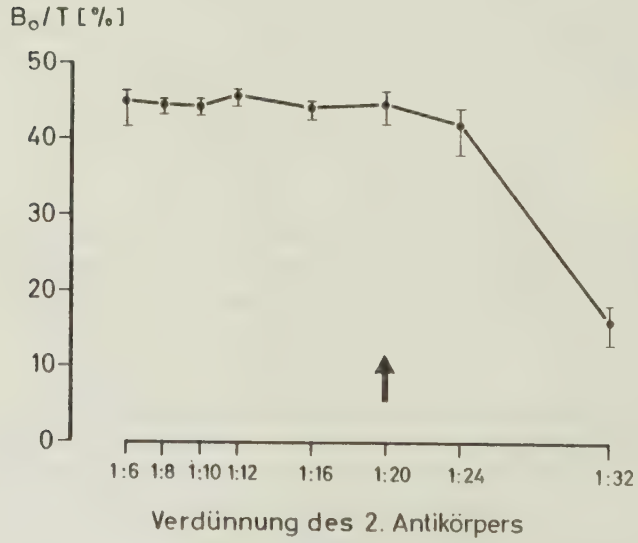


Abb. 3 : Verdünnungskurve des 2. Antikörpers

Diese Charge des 2. Antikörpers wurde in einer Verdünnung von 1 : 20 in den weiteren Versuchen eingesetzt.

Die maximale Bindung $\frac{B_o}{T}$ betrug bei diesem Versuch 45,6 % der Gesamtaktivität und wurde bei einer Verdünnung des 2. Antikörpers von 1 : 12 erreicht. Es zeigte sich, daß sich bei den Verdünnungen des 2. Antikörpers zwischen 1 : 6 und 1 : 20 in der Höhe der Ak-Tracerbindung ein Plateau einstellte. Die durchschnittliche Bindung betrug 44,6 % und wurde bei den einzelnen Verdünnungen nur wenig über- bzw. unterschritten. Bei einer Verdünnung des 2. Antikörpers von 1 : 24 zeigte sich gegenüber diesen Werten bereits ein Abfallen der B_o-Werte um 3 % auf circa 41,5 %, bei einer Verdünnung von 1 : 32 wurde nur mehr eine Bindung $\frac{B_o}{T}$ von circa 16 % der Gesamtaktivität erhalten.
Wegen der hohen Kosten des Anti-Kaninchen-γ-Globulins wurde diese Charge in einer Verdünnung von 1 : 20 in unseren Versuchen eingesetzt, da sich bei dieser Verdünnung die B_o-Werte noch im Plateau befanden.

3.1.2.3. Austesten der Inkubationsbedingungen

3.1.2.3.1. Vorinkubation / Tracerinkubation

Um eine optimale Reaktion von ACTH-Standard, Antikörper, Tracer und 2. Antikörper zu erzielen, müssen bestimmte Inkubationszeiten eingehalten werden.
Man unterscheidet zwischen einer "kalten" Vorinkubation, d. h. einer vorausgehenden Inkubation des Standards mit dem Antiserum und einer gleichzeitigen Inkubation von Standard, Antiserum und Tracer.

Bei verschiedenen Autoren herrschen unterschiedliche Meinungen darüber, ob eine "kalte" Vorinkubation die Empfindlichkeit von Eichkurven bei radioimmunologischen Bestimmungsmethoden erhöht (10). Um über die Rolle der Vorinkubation und über den Einfluß der Inkubationszeiten auf den Verlauf der Eichkurven Aufschluß zu erzielen, wurde folgender Vorversuch durchgeführt:

Es wurden 3 Eichkurven angesetzt:
Bei der 1. Eichkurve erfolgte eine kalte Vorinkubation von 21 h, die Inkubation nach Tracerzugabe betrug 48 h, die nach der Zugabe des 2. Antikörpers 5 h.
Bei der 2. Eichkurve erfolgte eine gleichzeitige Inkubation von Standard, Antikörper und Tracer von 48h, die Inkubation nach der Zugabe des 2.Ak's betrug 5 h.
Bei der 3. Eichkurve erfolgte ebenfalls eine gleichzeitige Inkubation von Standard, Ak und Tracer von allerdings nur 24 h, die Zeit nach der Zugabe des 2. Ak's betrug wieder 5 h.
Als Antiserum wurde K_{12} (Ulm) in einer Verdünnung von 1 : 7000 eingesetzt.

Bei der Kurve mit einer kalten Vorinkubation von 21 h wurde eine untere Nachweisgrenze von 5,2 pg/ml und ein 50-Prozent-Intercept von 77,5 pg/ml erhalten. Bei der 2. Kurve mit einer gleichzeitigen Inkubation von Standard, Ak und Tracer von 48 h betrug die untere Nachweisgrenze 7,3 pg/ml und der 50-Prozent-Intercept 157,7 pg/ml. Bei der 3. Kurve mit einer gleichzeitigen

Inkubation von Standard, Ak und Tracer von nur 24 h wurde eine untere Nachweisgrenze von 40,1 pg/ml und ein 50-Prozent-Intercept von 205,6 pg/ml erhalten (siehe Abb. 4).

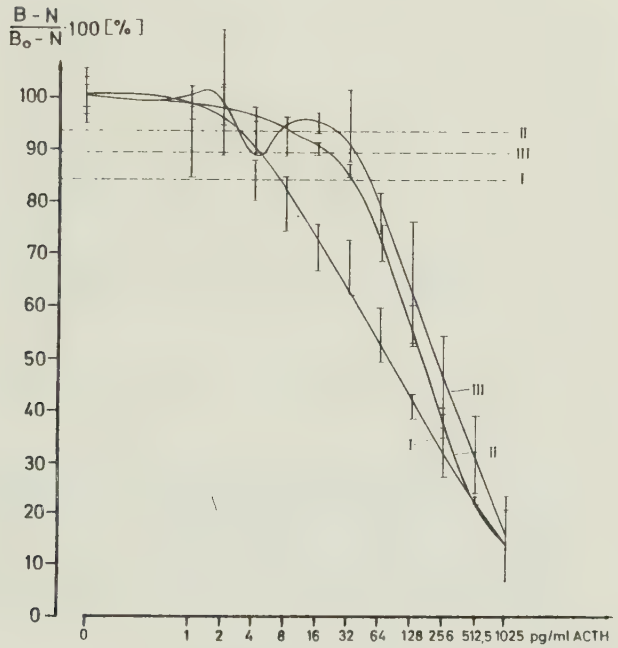


Abb. 4 : Standardkurven bei verschiedenen Inkubationszeiten

mit dem Antiserum K_{12} (Ulm)

Kurve I 21 h Vorinkubation von Standard und Ak; anschließend 48 h Tracerinkubation.

Kurve II 48 h gleichzeitige Inkubation von Standard, Ak und Tracer.

Kurve III 24 h gleichzeitige Inkubation von Standard, Ak und Tracer.

Das Ergebnis zeigt, daß eine kalte Vorinkubation die Empfindlichkeit und Steilheit der Eichkurven verbessert und die Gesamtdauer der Inkubationszeit ebenfalls den Verlauf der Eichkurven wesentlich beeinflußt. Es konnte z.B. bei einer gesamten Inkubationszeit von ca. 24 h keine bezüglich der Empfindlichkeit und Steilheit befriedigende Eichkurve erhalten werden.

Mit dem Antiserum K_{10} von der 3. Blutentnahme (Ak-Titer: 1 : 64 000) wurde eine Inkubationskinetik durchgeführt. Dabei wurden als Dreifachwerte in der üblichen Weise B_o-Werte angesetzt, wobei folgende Inkubationszeiten des Antiserums eingehalten wurden: 1/2, 1, 3, 5, 6, 14, 16, 18, 24, 30 und 48 h.

Die Bindung $\frac{B_o}{T}$ stieg im Laufe der angegebenen Inkubationszeiten kontinuierlich an, wobei auch nach 48 h noch kein Plateau in der Höhe der Bindung erreicht wurde (siehe Abb. 5). Der zeitabhängige Anstieg der Bindung nahm jedoch nach einer Inkubationszeit von ca. 24 h beträchtlich ab. So betrug die Bindung $\frac{B_o}{T}$ nach einer Inkubationszeit von 1 h ca. 8 %, nach 24 h 28,8 % und nach 48 % 32,3 % der Gesamtaktivität.

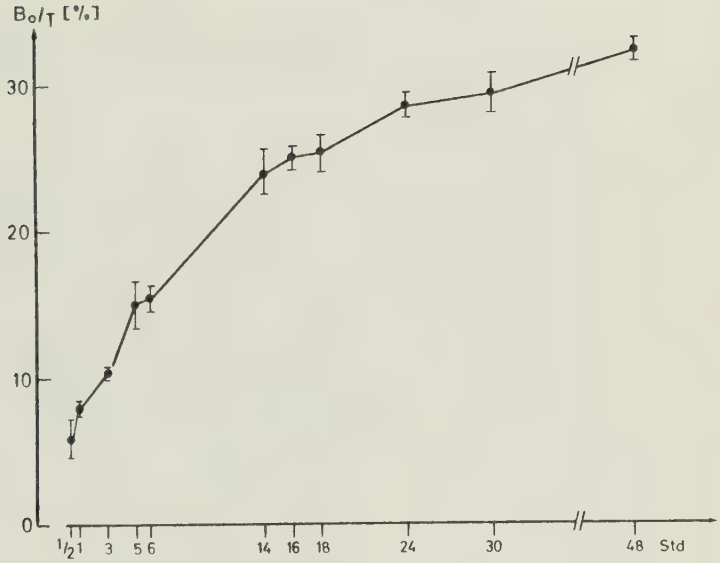


Abb. 5 : Inkubationskinetik des ACTH-Antiserums

(K_{10} von der 3. Blutentnahme
Ak-Titer: 1 : 64 000)

Bindung $\frac{B_o}{T}$ in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Aufgrund der Ergebnisse wurde bei unseren Versuchen eine kalte Vorinkubation von ca. 24 h eingehalten. Die Inkubation nach Tracerzugabe betrug ebenfalls ca. 24 h.

3.1.2.3.2. Inkubation des 2. Antikörpers

Um eine möglichst günstige Inkubationszeit des 2. Antikörpers zu ermitteln, wurde eine Bindungskinetik durchgeführt.

Dazu wurden als Dreifachwerte in der üblichen Weise B_o-Werte angesetzt, wobei als Antikörper K_{10} von der 3. Blutentnahme in einer Verdünnung von 1 : 64 000 eingesetzt wurde. Die Zugabe von 100 µl des 2. Antikörpers erfolgte nach einer Inkubation von circa 24h. Die Trennung von jeweils 3 Proben wurde 15, 30, 45, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 und 210 min nach der Zugabe des 2. Antikörpers vorgenommen. Die Trennung der letzten 3 B_o-Werte erfolgte nach 12 h.

Bis zu einer Inkubation des 2. Ak's von 1 h zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der B_o-Werte (siehe Abb. 6). Danach blieben die B_o-Werte annähernd konstant; auch die nach einer Inkubationszeit von 12 h gemessenen Werte unterschieden sich kaum von den nach 1 h erreichten. Wir fanden, daß eine Inkubation des 2. Ak's von 1 h ausreichend ist. Danach stellt sich ein Plateau ein, das sich auch bei sehr langer Inkubationszeit nicht mehr ändert. Um sicherzugehen, daß dieses Plateau bereits erreicht war, wurden unsere Versuche nach der Zugabe des 2. Antikörpers circa 1 1/2 h inkubiert.

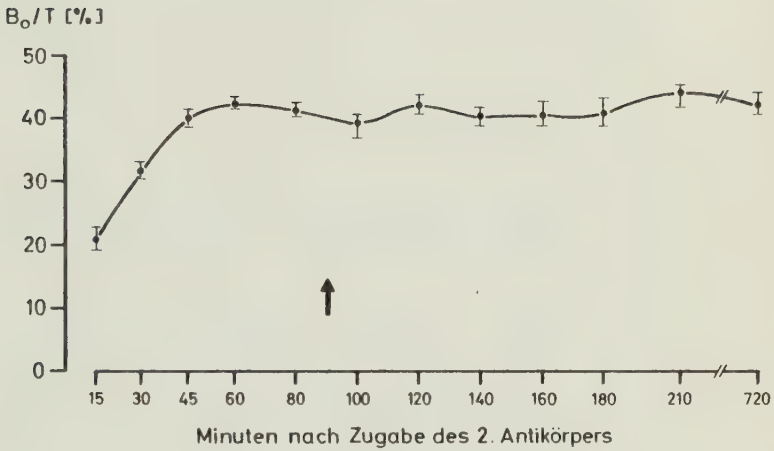


Abb. 6 : Inkubationskinetik des 2. Antikörpers

3.1.3. Entwicklung eines Extraktionsverfahrens mittels Säulenchromatographie

Da eine direkte ACTH-Bestimmung im Serum mit den bei der Immunisierung erhaltenen Antiseren nicht möglich war (siehe Kap. 3.2.2.3.), war eine Extraktion des ACTH aus dem Serum erforderlich.
Als Grundlage für das von uns durchgeführte Extraktionsverfahren mittels Kieselgel diente eine 1975 von LIOTTA und KRIEGER (22) beschriebene Methode:

Hierbei werden die Serumproben zunächst mit 1 n HCl auf einen pH-Bereich von 4,2 - 4,5 eingestellt. Anschließend wird pro Probe 60 mg angesäuertes Kieselgel zugegeben. (Das Kieselgel wurde vorher in 1 n HCl und anschließend in reichlich Aquabidest gewaschen und bei 180°C getrocknet.) Die Lösung wird 5 min geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Hierauf erfolgen Waschvorgänge mit jeweils 2 ml Aquabidest und 2 ml 1 n HCl. Die anschließende Elution wird in zwei Schritten durchgeführt, wobei jeweils 1 ml 50 %iges Aceton-Wassergemisch zugegeben wird und die Überstände nach dem Aufschütteln und Zentrifugieren der Proben vereinigt werden.
Das Einengen der Proben erfolgt im Nitrogenstrom in einem Wasserbad bei 50 - 55°C.

Da diese Methode mit relativ großem Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden ist, wurde sie durch den Einsatz der Säulenchromatographie modifiziert, wobei wir uns folgende Vorteile versprachen:

Das Wegfallen des häufigen Aufschüttelns und Zentrifugierens der Proben sowie der großen Zahl der Pipettierschritte würde eine Verminderung möglicher Fehlerquellen bedeuten.

Ein weiterer Gesichtspunkt wäre die eventuell mögliche Verwendung einer Mehr-Kanal-Proportionierpumpe zur Extraktion (17). Hierbei könnten mehrere Proben auf parallelen Säulen chromatographisch aufgetrennt werden, wobei das Auftragen der einzelnen Proben, Extraktionspuffer und Elutionsmittel, sowie das Sammeln der Eluate in Fraktionen jeweils zeitgesteuert automatisch abläuft (17).

Möglicherweise könnten die Säulen bei ausgiebigem Spülen mit Puffer nach der Extraktion bei mehreren Versuchen hintereinander verwendet werden, was eine weitere Arbeitserleichterung bedeuten würde.
Die Wiederverwendbarkeit der Säulen müßte jedoch noch überprüft werden.

Außer dem Einsatz der Säulenchromatographie wurden wesentliche Punkte des von LIOTTA und KRIEGER beschriebenen Extraktionsverfahrens beibehalten. Es wurden jedoch ein geeigneter Extraktionspuffer, eine günstige Salzsäurekonzentration sowie die jeweils erforderlichen Volumina der verschiedenen Lösungen speziell für unsere Methode ausgetestet (Versuche zusammen mit C. UHLIG).

3.1.3.1. Ermittlung eines geeigneten Extraktionspuffers

Es wurde überprüft, mit welchem Puffer sich eine möglichst hohe ACTH-Wiederfindung bei der Extraktion erreichen läßt.

Dazu wurden folgende Puffer hergestellt:

0,1 m Sörensen-Natrium-Citratpuffer pH 4,5
(Herstellung siehe Kap. 2.1.4.)

0,015 m Phosphatpuffer pH 4,5
9,073 g 1/15 m Monokaliumphosphat wurden mit Aquadest auf 1 Liter aufgefüllt (A).
11,87 g Dinatriumphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) wurden mit Aquadest ebenfalls auf 1 Liter aufgefüllt (B).
Um pH 4,5 zu erreichen, wurden 99,2 ml A mit 0,8 ml B vermischt.

0,1 n Walpole Natrium Acetatpuffer pH 4,5
8,204 g $C_2H_3O_2Na$ wurden mit Aquadest auf 1 Liter aufgefüllt (A).
Um pH 4,5 zu erreichen, wurden 44,9 ml A mit 55,1 ml 0,1 n Essigsäure vermischt.

Wie in Kap. 2.4.4.2. beschrieben, wurden Säulen hergestellt, wobei die verschiedenen Puffer zum Quellen des Kieselgels verwendet wurden. Anschließend wurde mit dem üblichen Extraktionsverfahren (siehe Kap. 2.4.4.2.) unter Verwendung der jeweiligen Puffer eine Extraktion durchgeführt.

Dazu wurden Tracerproben (1000 µl ACTH-freies Serum gemischt mit 200 µl einer Tracerverdünnung) eingesetzt, wobei die Aktivitäten jeweils vor der Extraktion, im Vorlauf und im Eluat gemessen wurden.

Wir erhielten folgendes Ergebnis (Mittelwerte aus Zweifachbestimmungen):

	Gesamtaktivität	Vorlauf	Eluat
Sörensen Citratpuffer	100 %	3,4 %	73.5 %
0,015 m Phosphatpuffer	100 %	3,6 %	62,8 %
Walpole Acetatpuffer	100 %	4,9 %	64,7 %

Die im Vorlauf gemessenen Aktivitäten waren mit 4 $\pm$ 0,9 % der Gesamtaktivität sehr gering.

Im Eluat wurde bei der Verwendung des Sörensen-Citratpuffers bei diesem Versucht mit 73,5 % die höchste Wiederfindung erhalten. Bei der Verwendung des 0,015 m Phosphatpuffers bzw. des Walpole-Acetatpuffers war die Ausbeute mit 62,8 bzw. 64,7 % bereits erheblich geringer.

3.1.3.2. Austesten einer geeigneten Salzsäure-Konzentration

Um eine geeignete Salzsäurekonzentration zu ermitteln, wurde eine Extraktion von Tracerproben (siehe oben) durchgeführt, wobei das übliche Extraktionsschema (siehe Kap. 2.4.4.2.) durch die Verwendung unterschiedlicher HCl-Konzentrationen - von 1 n bis 0,05 n HCl - variiert wurde. Die Aktivität der Proben wurde jeweils vor der Extraktion, im Vorlauf und im Eluat gemessen.

Das Ergebnis ist in folgender Tabelle zusammengestellt (Mittelwerte aus Zweifachbestimmungen):

	Vorlauf in % der Gesamtaktivität	Eluat in % der Gesamtaktivität
0,05 n HCl	-	32,8
0,1 n HCl	8,1	66,2
0,2 n HCl	8,4	74,2
0,3 n HCl	7,9	73,6
0,4 n HCl	8,0	69,0
0,5 n HCl	8,0	74,0
0,6 n HCl	8,0	70,4
0,7 n HCl	8,4	74,8
0,8 n HCl	8,1	73,6
0,9 n HCl	8,8	74,8
1 n HCl	8,3	76,0

Im Vorlauf ergab sich eine durchschnittliche Aktivität von 8,2 % der eingesetzten Gesamtaktivität.

Im Eluat wurde bei der Verwendung von 0,2 n - 1 n HCl eine durchschnittliche Wiederfindung von 73,4 % erhalten, wobei zwischen den einzelnen Proben nur relativ geringe Abweichungen bestanden. Die höchste Wiederfindung betrug 76,0 % und wurde bei der Verwendung von 1 n HCl erhalten. Bei der Extraktion mit 0,1 n HCl war die Wiederfindung mit 66,2 % bereits geringer, bei der Extraktion mit 0,05 n HCl betrug sie nur noch 32,8 %.

In einem weiteren Vorversuch wurde gezeigt, daß die pH-Werte der Proben nach dem Einengen und der Wiederaufnahme im Puffer u.a. in Abhängigkeit von der Höhe der jeweils bei der Extraktion eingesetzten Salzsäurekonzentration mehr oder weniger stark abfielen (siehe Kap. 3.1.4.2.). Da jedoch ein möglichst geringes Abfallen der pH-Werte nach der Wiederaufnahme der Proben im Puffer angestrebt wurde, wurde bei der Extraktion 0,2 n HCl verwendet, da hiermit bei relativ geringer Salzsäurekonzentration noch eine ausreichend hohe Wiederfindung erhalten wurde.

3.1.3.3. ACTH-Wiederfindung in Abhängigkeit vom pH-Wert der Extraktion

Nach Untersuchungen von YALOW und BERSON (65) kann durch niedrige pH-Werte oder durch die Zugabe hoher Proteinkonzentrationen zum Testansatz die Adsorption des ACTH an der Wand von Glas- oder Plastikwaren verhindert werden. FEHM et al. (11) wiesen in radiochro-

matographischen Untersuchungen nach, daß ACTH im Serum an eine Substanz mit hohem Molekulargewicht gebunden wird. Die Bindung an diesen "binding factor" konnte jedoch durch niedrige pH-Werte bzw. die Zugabe von Ca^{++}-Ionen im Überschuß verhindert werden. Aus diesen Gründen hielten wir eine Extraktion im sauren pH-Bereich - wie auch von LIOTTA und KRIEGER beschrieben - für zweckmäßig.

Es wurde die prozentuale ACTH-Wiederfindung bei den pH-Werten 4,5, 4,2, 4 und 3,2 untersucht. Dabei wurden Tracerproben (900 µl ACTH-freies Serum gemischt mit 100 µl einer Tracerverdünnung) und der verwendete Extraktionspuffer (0,1 m Na-Citratpuffer) auf die jeweiligen pH-Werte eingestellt und auf die übliche Weise eine Extraktion durchgeführt.

Wir erhielten folgendes Ergebnis
(Mittelwerte aus Zweifachbestimmungen) :

	pH 4,5	pH 4,2	pH 4	pH 3,2
Wiederfindung in % der eingesetzten Gesamtaktivität	77,7	78,0	76,7	70,7

LIOTTA und KRIEGER (22) beschrieben, daß die Extraktion nicht in einem pH-Bereich unter pH 4 durchgeführt werden sollte, da bei niedrigeren pH-Werten größere ACTH-Mengen nicht an Kieselgel adsorbiert werden. Auch bei unserem Versuch wurde bei dem nied-

rigsten pH-Wert (pH 3,2) die geringste Wiederfindung erhalten, die jedoch noch immerhin ca. 70 % der eingesetzten ACTH-Menge betrug.

Die Wiederfindung stieg von pH 3,2 bis zu pH 4,5 an, wobei allerdings die Differenz zwischen pH 4 und pH 4,5 relativ gering war.

In dem von LIOTTA und KRIEGER beschriebenen und auch von uns beibehaltenen pH-Bereich von pH 4,2 - pH 4,5 ergab sich bei diesem Versuch eine annähernd konstante Wiederfindung, wobei die Differenz der Wiederfindung nur ungefähr 0,3 % der eingesetzten Gesamtaktivität und somit der ACTH-Menge betrug.

3.1.3.4. Austesten der erforderlichen Volumina der bei der Extraktion verwendeten Lösungen

Anhand einer Extraktion von Tracerproben (siehe oben) wurden die erforderlichen Volumina des verwendeten Extraktionspuffers und Elutionsmittels (0,1 m Na-Citratpuffer pH 4,2 - 4,5, 0,2 n HCl und 50 %iges Aceton-Wassergemisch) ausgetestet.

Dabei wurden nach dem Auftragen der Tracerproben die verschiedenen Lösungen in Fraktionen von jeweils 0,5 ml auf die Säulen aufgetragen. Die entsprechenden Aktivitäten wurden im Vorlauf bzw. im Eluat ebenfalls in Fraktionen von 0,5 ml gemessen (Ergebnis: siehe Abb. 13: Elutionsprofil).

Wir fanden, daß mit der Zugabe von jeweils 2 ml 0,1 m Na-Citratpuffer und 2 ml 0,2 n HCl sowie 3 ml 50 %igem Aceton-Wassergemisch eine ausreichende Wiederfindung erzielt werden konnte.

Wurden größere Volumina der entsprechenden Lösungen auf die Säulen aufgetragen, waren die in späteren Fraktionen gemessenen Aktivitäten im Vorlauf bzw. im Eluat nur noch sehr gering. Das heißt, daß durch den Einsatz größerer Volumina, z.B. von Aceton-Wassergemisch, die ACTH-Ausbeute nicht mehr wesentlich gesteigert werden könnte.

Um zu überprüfen, ob die Wiederfindung von der eingesetzten ACTH-Menge abhängig ist, wurden Tracerproben extrahiert, wobei bei einer Probe zusätzlich 5 µg ACTH zugegeben wurden. Die im Eluat gemessenen Aktivitäten unterschieden sich bei diesen Proben nur um 0,4 % der eingesetzten Gesamtaktivität, d.h. daß die Wiederfindung auch bei der Zugabe einer so großen ACTH-Menge unverändert blieb.

3.1.3.5. Überprüfung der Wiederverwendbarkeit der Säulen

Um die Wiederverwendbarkeit der Säulen zu überprüfen, wurde auf 3 verschiedenen Säulen 5 mal hintereinander eine Extraktion von Tracerproben (siehe oben) durchgeführt, wobei nach jeder Extraktion die Säulen ausgiebig mit 0,1 m Na-Citratpuffer pH 4,5 gespült wurden.

Die Aktivitäten wurden im Vorlauf und im Eluat gemessen. Es zeigte sich, daß die Tracerwiederfindung nach den einzelnen Extraktionen erheblich schwankte. Bei den meisten späteren Extraktionen wurde im Vergleich zur ersten Extraktion auf derselben Säule eine niedrigere Wiederfindung erhalten, bei keiner einzigen Probe zeigte sich eine im Vergleich zur 1. Extraktion höhere Wiederfindung.

Im Vorlauf wurden dagegen bei späteren Extraktionen höhere Countzahlen erhalten, was damit erklärt werden kann, daß auf den Säulen eine Restaktivität verblieben war, die bei der darauffolgenden Extraktion im Vorlauf erschien.

Bei einem weiteren Versuch zeigte sich, daß unter sonst gleichen Versuchsbedingungen die ACTH-Wiederfindung bei Verwendung neuer Säulen (n = 4) circa 6 % höher war als bei der Verwendung bereits gebrauchter Säulen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Säulen vor jedem Versuch neu hergestellt.

3.1.4. Anwendung des Extraktionsverfahrens bei der radioimmunologischen ACTH-Bestimmung

3.1.4.1. ACTH-Verlust beim Einengen im Rotationsverdampfer

Die eluierten Proben wurden in einem Rotationsverdampfer circa 1 1/2 h bei Zimmertemperatur und anschließend 1/2 h bei 50°C eingeengt. Bei einigen Versuchen wurde auch ein "Vortex Evaporator" eingesetzt (siehe Kap. 2.4.5.).

Anhand von Tracerproben (n = 4) wurde der durch das Einengen bedingte ACTH-Verlust ermittelt, der mit circa 0,5 % der eingesetzten Gesamtaktivität sehr gering war. Da hierbei jedoch nur radioaktives Jod gemessen wurde, eine Zerstörung des ACTH selbst aber während des Einengens aufgrund der ausgeprägten Wärmeempfindlichkeit (5, 27, 28, 39, 42) des Hormons denkbar wäre, wurde folgender Versuch durchgeführt:

Es wurden die im Puffer gelösten Standardverdünnungen einer ACTH-Eichkurve ohne vorherige Extraktion auf die übliche Weise eingeengt, wieder in je 1 ml Puffer aufgenommen und zum Vergleich mit einer ACTH-Standardkurve ohne vorheriges Einengen der Proben im RIA eingesetzt.

Bei diesem Versuch erhielten wir zwei annähernd deckungsgleiche Eichkurven, wobei die Bindung in %

der Gesamtaktivität bei der Standardkurve nach dem Einengen und der Wiederaufnahme der Proben im Puffer (Kurve B) um durchschnittlich 1,7 % höher lag als bei der Vergleichsstandardkurve. Der B_o-Wert lag bei der Kurve B ebenfalls um ca. 1,8 % höher als bei der Vergleichskurve A.

Die Bindung in Prozent des B_o-Werts war bei Kurve B (d.h. der Standardkurve nach dem Einengen der Proben) um durchschnittlich ca. 2,3 % höher als bei der Vergleichskurve A, d.h., daß diese Eichkurve einen geringfügig flacheren Verlauf hatte, was auf geringe ACTH-Verluste zurückgeführt werden kann.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß das Einengen der Proben nicht zu einer wärmebedingten Zerstörung des ACTH in größerem Umfang führte. Es sei jedoch bereits hier darauf hingewiesen, daß das Einengen der Proben mit großen Fehlermöglichkeiten verbunden war, z. B. variierte die Dauer des Einengens je nach der Höhe des Wasserdrucks, ein Herausspritzen des Acetons aus den Röhrchen war bei zu hohem Druck leicht möglich, das Aufschütteln der Proben nach dem Einengen bereitete zum Teil Schwierigkeiten usw. (siehe auch Kap. 3.2.6.).

3.1.4.2. Überprüfung der pH-Werte nach dem Einengen und der Wiederaufnahme der Proben in Puffer

Da die Extraktion im sauren pH-Bereich durchgeführt wurde, war mit einem Abfallen der pH-Werte nach dem Einengen und der Wiederaufnahme der Proben in Puffer zu rechnen.
Um die Höhe dieser pH-Wert-Differenz zu ermitteln, wurden 6 Proben auf die übliche Weise extrahiert und eingeengt.
Danach erfolgte die Aufnahme von jeweils 2 Proben in je 1 ml 0,05 m Veronalpuffer mit den pH-Werten 8,6, 8,0 und 7,2.

Es wurden folgende pH-Veränderungen beobachtet:

Bei Aufnahme in 0,05 m Veronalpuffer	pH-Werte nach der Wiederaufnahme der Proben in Puffer
pH 8,6 :	pH 8,05; pH 7,95
pH 8,0 :	pH 7,64; pH 7,75
pH 7,2 :	pH 7,12; pH 6,83

Aufgrund des Ergebnisses wurden bei einigen späteren Versuchen die Proben in je 1 ml 0,05 m Veronalpuffer pH 8,0 aufgenommen und der RIA bei einem pH-Wert von 7,7 durchgeführt.
Es zeigte sich jedoch, daß bei dieser Versuchsanordnung die pH-Werte einiger Proben nach der Wiederaufnahme in Puffer wesentlich stärker als bei dem oben beschriebenen Vorversuch abfielen. Dabei bestanden so-

wohl Unterschiede zwischen den einzelnen Proben desselben Versuchs, als auch zwischen den Versuchen untereinander; z. B. hatten bei einem Versuch 8 Proben pH-Werte zwischen 7,6 und 7,8, während bei 3 Proben die pH-Werte auf pH 2,2 bis 5,8 abgefallen waren. Bei einem anderen Versuch hatten dagegen die meisten Proben (n = 8) pH-Werte zwischen pH 4 - 6.

Um diese großen pH-Wert-Differenzen zu verhindern, wurden folgende Möglichkeiten untersucht:

Das Abfallen der pH-Werte ist z.T., wie bereits in Kap. 3.1.3.2. beschrieben, von der bei der Extraktion verwendeten Salzsäurekonzentration abhängig. Es wurde daher zunächst besonders darauf geachtet, daß vor der Elution des ACTH mit Aceton-Wassergemisch die Salzsäure von den Säulen möglichst gut abgetropft war. Es konnte jedoch durch diese Maßnahme ein Abfallen der pH-Werte einiger Proben in einen sauren pH-Bereich nicht verhindert werden. Daher wurde versucht, die HCl-Konzentration bei der Extraktion auf den Säulen zu vermindern, indem nach der Zugabe der 0,2 n HCl und vor der Elution des ACTH die Säulen nochmals mit je 1 ml 0,1 m Natriumcitratpuffer pH 4,2 - 4,5 gespült wurden. Hierbei wurde jedoch nur eine ACTH-Wiederfindung von ca. 45 % erhalten. Es scheint also für eine ausreichende Elution des ACTH von den Säulen eine genügend hohe HCl-Konzentration erforderlich zu sein. Dies wurde bereits in dem in Kap. 3.1.3.2. beschriebenen Vorversuch festgestellt.

Als weitere Möglichkeit, ein Abfallen der pH-Werte nach der Wiederaufnahme der Proben in Puffer zu verhindern, wurde die Verwendung höhermolarer Puffer untersucht, wobei 0,15 m, 0,2 m und 0,4 m Veronalpuffer pH 8,0 sowie 0,2 m und 0,4 m Phosphatpuffer pH 8,2 eingesetzt wurden. Zunächst wurden eingeengte Proben mit diesen Puffern aufgenommen und die Höhe der pH-Werte gemessen.

Dabei zeigte sich, daß die Veronalpuffer nach der Aufnahme der eingeengten Proben auskristallisierten, so daß sich diese Puffer für unsere Versuche nicht eigneten.
Nach der Aufnahme in 0,2 m Phosphatpuffer pH 8,25 lagen die pH-Werte von 7 extrahierten und eingeengten Proben zwischen pH 8,14 - 8,18, bei der Aufnahme in 0,4 m Phosphatpuffer pH 8,25 lagen die pH-Werte von 7 Proben bei pH 8,19. Trotz dieser guten Übereinstimmung wurden auch bei späteren Versuchen die pH-Werte nach der Wiederaufnahme der Proben in Puffer gemessen, da gelegentlich auch bei der Verwendung höhermolarer Puffer die pH-Werte einiger Proben unter den oben angegebenen Bereich abfielen. Dies war möglicherweise durch Gelrückstände bedingt, die während der Extraktion in die Röhrchen gelangten.

3.1.4.3. Abhängigkeit des Eichkurvenverlaufs vom pH-Wert des Puffers

Wegen des im vorigen Kapitel ausführlich dargestellten Abfalls der pH-Werte nach dem Einengen der Proben stellte sich die Frage, inwieweit die jeweilige Höhe des pH-Werts den Verlauf der Eichkurven beeinflußt bzw. in welchem Bereich die pH-Werte übereinstimmen müssen, um noch identische Werte zu erhalten.

Um dies zu überprüfen, wurde 0,05 m Veronalpuffer mit den pH-Werten 6,7, 7,25, 7,5, 7,75, 8,0, 8,25, 8,50 und 9,0 hergestellt. Die Puffer enthielten wie üblich 1 % BSA, 0,04 % Mercaptoäthanol und Trasylol (400 KIE/ml). Unter Verwendung dieser Puffer wurden Standardkurven erstellt.

Es zeigte sich, daß die Kurven bei den pH-Werten 6,7, 7,25, 7,5, 7,75 und 9,0 mit einem durchschnittlichen 50-Prozent-Intercept von 71,8 pg/ml einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf aufwiesen. Die Eichkurve bei pH 6,7 verlief dabei mit einem 50-Prozent-Intercept von 58,2 pg/ml am steilsten, während die Unterschiede zwischen den übrigen Eichkurven nicht als signifikant betrachtet werden können (siehe Abb. 7).
Die bei pH 8,0, 8,25 und 8,5 erstellten Kurven zeigten dagegen mit einem durchschnittlichen 50-Prozent-Intercept von ca. 286 pg/ml einen wesentlich flacheren Verlauf, wobei die Unterschiede zwischen diesen Eichkurven ebenfalls nicht als signifikant zu betrachten sind. In Bezug auf die untere Nachweisgrenze der Kurven ließen sich dagegen keine charakteristischen pH-abhängigen Besonderheiten erkennen.

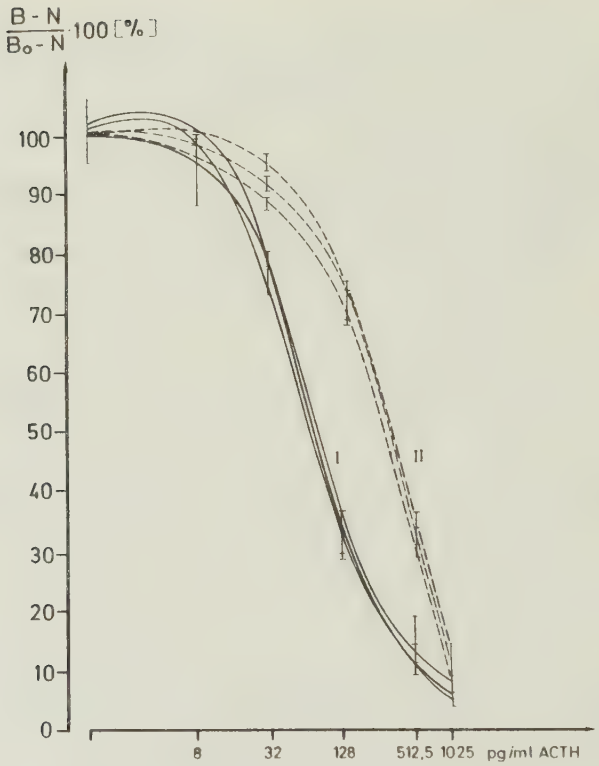


Abb. 7 : Standardkurven in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers

I Standardkurven bei pH 7,25, 7,50 und 7,75

II Standardkurven bei pH 8,0, 8,25 und 8,50

Als Antiserum wurde K_{10} von der 3. Blutentnahme in einer Verdünnung von 1 : 64 000 eingesetzt.

Worauf der erhebliche Unterschied im Kurvenverlauf zwischen den pH-Bereichen 7 - 8 und 8 - 9 zurückzuführen ist, ist nicht ohne weiteres erklärbar. Er könnte jedoch möglicherweise mit einer pH-Abhängigkeit der Höhe der Bindung des Tracers an das Antiserum erklärt werden, die auch von uns in einigen Vorversuchen nachgewiesen wurde (z.B. zeigte ein Antiserum in einer Verdünnung von 1 : 32 000 bei einem pH-Wert von 8,6 eine Bindung $\frac{B_O}{T}$ von 43 % der eingesetzten Gesamtaktivität, bei pH 8,0 unter sonst gleichen Versuchsbedingungen eine Bindung von 36,6 % und bei pH 7,2 eine Bindung von 55,0 % der Gesamtaktivität).

Bei unserem Versuch fiel auf, daß die B_O-Werte im pH-Bereich 7,25 - 7,75 circa 29,5 % der Gesamtaktivität betrugen, im pH-Bereich 8,0 - 8,5 dagegen nur circa 23,4 % der Gesamtaktivität.
Möglicherweise ist also die in diesem Versuch eingesetzte Antiserum-Verdünnung, die bei pH 7,7 ausgetestet wurde, im pH-Bereich 8,0 - 8,5 weniger günstig (siehe Kap. 3.1.2.1.).

Günstig für unsere Extraktionsversuche war jedoch, daß in gewissen pH-Bereichen annähernd unveränderte Eichkurven erhalten wurden. Die pH-Werte der extrahierten Proben konnten also nach dem Einengen und der Wiederaufnahme in Puffer in einem gewissen Bereich schwanken und mußten nicht exakt auf einen bestimmten pH-Wert, z.B. pH 7,7, eingestellt werden.

3.1.4.4. Abhängigkeit des Eichkurvenverlaufs von der Molarität des verwendeten Puffers

Wie bereits in Kap. 3.1.4.2. beschrieben, bestanden bei der Verwendung relativ hochmolarer Puffer nach der Wiederaufnahme der extrahierten und eingeengten Proben nur sehr geringe Unterschiede in der Höhe der pH-Werte zwischen den einzelnen Proben.

Um zu überprüfen, ob diese hochmolaren Puffer auch zur Herstellung von Eichkurven geeignet seien und um eventuelle Veränderungen des Eichkurvenverlaufs in Abhängigkeit von der Molarität des verwendeten Puffers festzustellen, wurde folgender Versuch durchgeführt:

Es wurde 0,05 m, 0,07 m, 0,08 m, 0,09 m, 0,1 m und 0,15 m Veronalpuffer, pH 7,7, hergestellt. Eine Verwendung höhermolarer Puffer war nicht möglich, da die Veronalpuffer mit höherer Molarität auskristallisierten. Mit den Puffern wurden nach der Zugabe von Albumin, Mercaptoäthanol und Trasylol in der üblichen Konzentration Eichkurven erstellt.

Es zeigte sich, daß alle Puffer zur Herstellung von Eichkurven geeignet waren. Veränderungen der Molarität des Puffers bewirkten jedoch z. T. starke Veränderungen des Eichkurvenverlaufs. Hierbei ließen sich jedoch - im Gegensatz zur Auswirkung des pH-Wertes auf den Eichkurvenverlauf - keine systematischen Ver-

änderungen erkennen.Die steilste und empfindlichste Eichkurve (untere Nachweisgrenze 4,3 pg/ml, 50-Prozent-Intercept 31,6 pg/ml) wurde mit dem 0,05 m Veronalpuffer erhalten. Die Eichkurven mit dem 0,09 m, 0,1 m und 0,15 m Veronalpuffer hatten einen ähnlichen Verlauf. Flacher und unempfindlicher waren die mit dem 0,07 m und 0,08 m Veronalpuffer durchgeführten Eichkurven. Der 50-Prozent-Intercept betrug 59,4 bzw. 81,1 pg/ml, die untere Nachweisgrenze 5,7 bzw. 18,2 pg/ml.

Erstaunlicherweise führten sogar relativ geringfügige Änderungen der Molarität des Puffers zu recht erheblichen Veränderungen der zugehörigen Eichkurven.

Die Höhe der B_o-Werte variierte von 33,5 % der Gesamtaktivität bei der Verwendung des 0,05 m Veronalpuffers bis zu 41,2 % bei der Verwendung des 0,09 m Veronalpuffers. Insgesamt gesehen hatten die höhermolaren Puffer geringfügig höhere B_o-Werte als die niedriger molaren. Dies ist jedoch keine hinreichende Erklärung für den unterschiedlichen Verlauf der zugehörigen Standardkurven.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Berechnung der spezifischen Aktivität des Tracers

Bei der Markierung mit 1/2 mCi ^{125}J ergaben sich folgende Zahlenverhältnisse der "Quso-Adsorption", d.h. der bei der Reinigung des Tracers an Quso adsorbierten Aktivität, und des "Quso-Sediments", d. h. der nicht mehr vom Quso eluierten Aktivität (siehe Kap. 2.2.3.) bezogen auf die insgesamt eingesetzte Radioaktivität:

	Radioaktivität bezogen auf die Gesamtaktivität
Gesamtaktivität	100 % ≙ 0,5 mCi ^{125}J
Quso-Adsorption	92,1 %
Quso-Sediment	71,7 %

Wenn man annimmt, daß das gesamte eingesetzte ACTH markiert und im Gegensatz zu freiem radioaktivem Jod an Quso adsorbiert wurde (siehe Kap. 2.2.3.), wurden bei dieser Markierung 0,5 µg ACTH mit ca. 0,45 mCi ^{125}Jod markiert, so daß sich die spezifische Aktivität des Tracers zu ≈ 900 mCi/mg errechnet. Hierbei ist ein ACTH-Molekül mit etwa 2 radioaktiven Jod-Atomen markiert (3, 63).

Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurde bei dieser

Markierung insgesamt nur etwa 0,1 µg markiertes ACTH wieder vom Quso eluiert, so daß 100 µl Tracer in der im Assay eingesetzten Endverdünnung circa 2 - 5 pg markiertes ACTH enthielten.

3.2.2. Immunisierung

3.2.2.1. Verlaufsbeobachtung der Ak-Titer während der Immunisierung

Unter Ak-Titer wird im folgenden diejenige Antiserum-Verdünnung verstanden, von der 200 µl im Assay eingesetzt wurden (siehe Kap. 2.4.6.). Die Bindung des Tracers an das verdünnte Antiserum betrug dabei etwa 30 % der Gesamtaktivität des Tracers (siehe Kap. 3.1.2.1.). Würde man den Begriff Ak-Titer auf den gesamten Testansatz im RIA, d. h. die Endverdünnung des Antiserums beziehen, müßte man die im folgenden angegebenen Werte mit 3,5 multiplizieren, da der Testansatz in unserem RIA insgesamt 700 µl betrug.

Bereits bei der 1. Blutentnahme, 10 Tage nach der 3. Boosterung, hatten alle Kaninchen auf die Immunisierung angesprochen, die Titer waren jedoch noch relativ niedrig. Die höchsten Titer lagen in einer Größenordnung von 1 : 1000 und wurden von 4 Kaninchen erreicht (siehe Abb. 8).

Bereits 6 Wochen später bei der 2. Blutentnahme wurde eine erhebliche Verbesserung der Antiseren beob-

achtet, obwohl keine weitere Boosterung erfolgt war. Bei 4 Kaninchen war der Ak-Titer bei einer Tracerbindung von ca. 30 % ≙ 1 : 16 000, wobei der höchste Titer (K_5) bei 1 : 50 000, der niedrigste bei 1 : 1 000 lag.

Nach einer weiteren Boosterung verbesserten sich die Antiseren erneut, so daß nach der 3. Blutentnahme bereits die Antiseren von 3 Kaninchen in einer Verdünnung ≙ 1 : 32 000 im Assay eingesetzt werden konnten, wobei der höchste Titer (K_{10}) bei einer Verdünnung von 1 : 64 000 lag.

Die 4. und 5. Blutentnahme brachten ebenfalls gute Ergebnisse. Die Titer blieben bei einigen Kaninchen konstant, bei anderen stiegen sie weiter an, bei einigen Kaninchen wurde allerdings auch ein Abfallen der Titer beobachtet.

Nach der 6. Blutentnahme, die nach der 8. Boosterung vorgenommen wurde, zeigte sich bei 2 Kaninchen ein Abfallen des Ak-Titers, bei einem ein leichter Anstieg und bei 2 Kaninchen (K_5 und K_{11}) ein Anstieg der Ak-Titer auf Werte von 1 : 96 000 und 1 : 128 000. Bei der letzten Blutentnahme waren die Titer 1:32 000 (K_8) und 1 : 64 000 (K_{11}) (siehe Abb. 8).

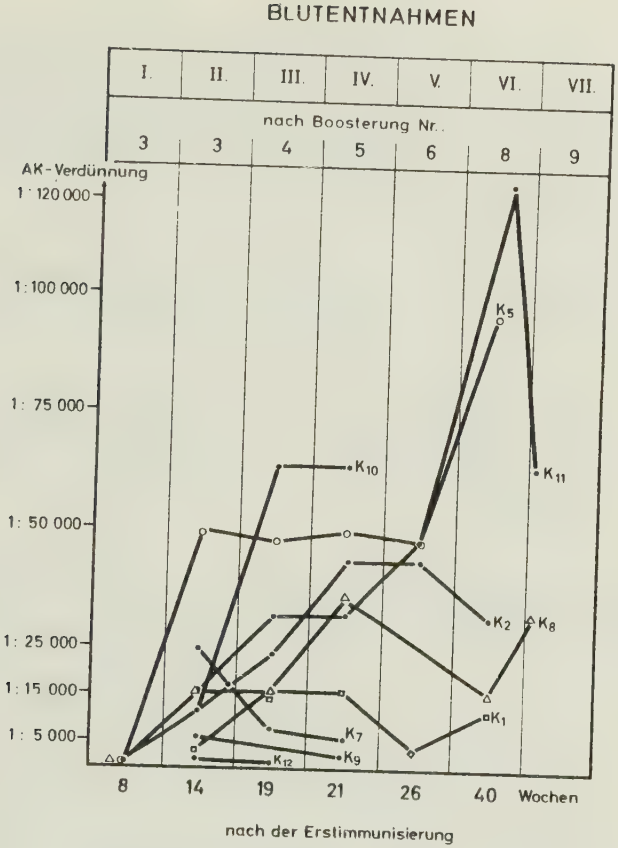


Abb. 8 : Ak-Titer im Laufe der Blutentnahmen

Mit Ausnahme von den Kaninchen, die bereits nach der 3., 4. oder 5. Boosterung gestorben waren, zeigten alle Kaninchen im Laufe des Immunisierungsprogramms bei mehreren Blutentnahmen hohe Antikörpertiter (siehe Abb. 8).

3.2.2.2. Eichkurven mit den erhaltenen Antiseren

Mit den bei der 2., 3., 6. und 7. Blutentnahme erhaltenen Antiseren wurden Eichkurven hergestellt, um die Verwendbarkeit der Seren im ACTH-RIA zu überprüfen.

Nach der 2. Blutentnahme wurden dabei insgesamt 8 Eichkurven erstellt, da 3 Kaninchen bereits gestorben waren und ein Antiserum wegen des zu niedrigen Titers von 1 : 2 000 nicht eingesetzt wurde. 5 Eichkurven - mit den Antiseren K_5, K_7, K_8, K_9 und K_{11} - waren bezüglich der unteren Nachweisgrenze und der Steilheit für einen ACTH-RIA gut geeignet. Das beste Ergebnis wurde mit dem Antiserum K_5 erhalten, das in einer Verdünnung von 1 : 50 000 eingesetzt wurde: Die Eichkurve hatte eine untere Nachweisgrenze von 2,1 pg/ml und einen 50-Prozent-Intercept von 54,7 pg/ml. Die Antiseren K_2 und K_{10} waren dagegen aufgrund der höheren unteren Nachweisgrenze (ca. 40 pg/ml), das Antiserum K_1 wegen des flacheren Kurvenverlaufs nicht so gut brauchbar.

Nach der 3. Blutentnahme lieferten prinzipiell alle 7 eingesetzten Antiseren brauchbare Eichkurven. Das beste Ergebnis wurde mit dem Antiserum K_{10} erhalten: Die Eichkurve hatte eine untere Nachweisgrenze von 2,7 pg/ml und einen 50-Prozent-Intercept von 20,7 pg/ml. Die mit den Antiseren K_7, K_8 und K_9 erstellten Eichkurven zeigten demgegenüber mit einem 50-Prozent-Intercept von 225 - 299 pg/ml einen deutlich flacheren Kurvenverlauf.

Von den 5 eingesetzten Antiseren der 6. Blutentnahme erwiesen sich 4 (K_1, K_2, K_5 und K_{11}) als gut geeignet, die Eichkurve mit dem Antiserum K_8 verlief deutlich flacher als die anderen (siehe Abb. 9).

Die bei der letzten Blutentnahme erhaltenen Antiseren K_8 und K_{11} lieferten ebenfalls gut geeignete Eichkurven.

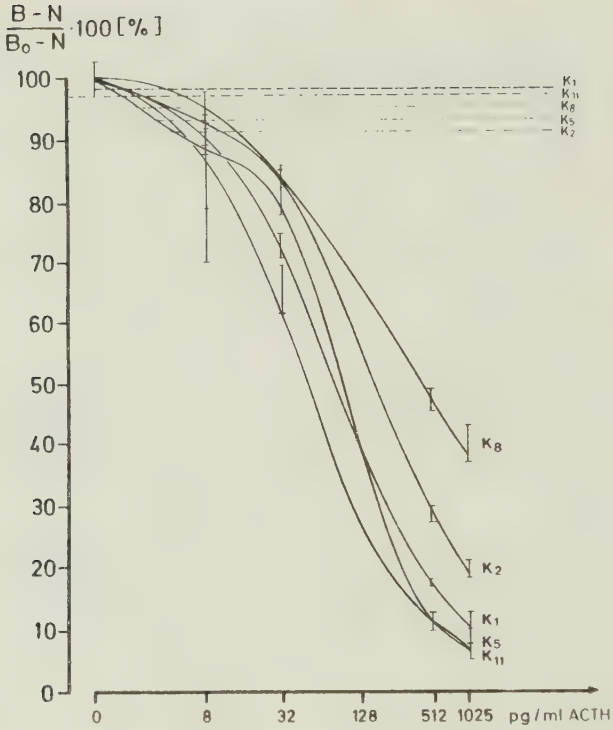


Abb. 9 : Standardkurven mit den bei der 6. Blutentnahme erhaltenen Antiseren

K_1 : Ak-Titer: 1 : 12 000
K_2 : Ak-Titer: 1 : 32 000
K_5 : Ak-Titer: 1 : 96 000
K_8 : Ak-Titer: 1 : 16 000
K_{11} : Ak-Titer: 1 : 128 000

Wenn die Antiseren derselben Kaninchen nach verschiedenen Blutentnahmen im Assay eingesetzt wurden, wurden z. T. unabhängig von der jeweiligen Höhe des Ak-Titers Verbesserungen, Verschlechterungen und ein annäherndes Konstantbleiben des Eichkurvenverlaufs festgestellt.
Z. B. verliefen die Eichkurven mit dem Antiserum K_5 trotz einer Zunahme des Titers von 1 : 50 000 nach der 2. bis 1 : 96 000 nach der 6. Blutentnahme annähernd identisch. Der 50-Prozent-Intercept lag bei beiden Kurven in einem Bereich von ungefähr 54 pg/ml.

Das Antiserum K_8 zeigte trotz eines annähernd gleichen Titers von ungefähr 1 : 16 000 nach der 2. und 6. Blutentnahme eine kontinuierliche Verschlechterung der Steilheit der Eichkurven. Der 50-Prozent-Intercept betrug nach der 6. Blutentnahme 454 pg/ml, nach der 2. Blutentnahme 144 pg/ml.

Beim Antiserum K_1 stellte sich dagegen bei einem nicht sehr hohen Anstieg des Titers von 1 : 4000 bei der 2. bis 1 : 12 000 bei der 6. Blutentnahme eine sehr wesentliche Verbesserung des Kurvenverlaufs nach der 6. gegenüber der 2. Blutentnahme ein (siehe Abb. 9).

Als Gesamtergebnis läßt sich feststellen, daß mit dieser Immunisierungsmethode (siehe Kap. 2.3.) bei allen Kaninchen, die die 4. Boosterung überlebt hatten (insgesamt 8 Kaninchen), bei einer oder mehreren Blutentnahmen ein brauchbares Antiserum gewonnen wur-

de. Die besten Eichkurven lieferten dabei die Antiseren K_5 von der 2. Blutentnahme, K_{10} von der 3. Blutentnahme, K_1, K_5 und K_{11} von der 6. Blutentnahme sowie K_8 und K_{11} von der 7. Blutentnahme. Die unempfindlichsten Eichkurven wurden trotz des relativ hohen Titers mit dem Antiserum K_2 erhalten. Mit diesem Antiserum konnte jedoch nach der 6. Blutentnahme eine Eichkurve mit einer unteren Nachweisgrenze von ca. 10 pg/ml und einem 50-Prozent-Intercept von 183 pg/ml erstellt werden (siehe Abb. 9).

Das Antiserum mit dem niedrigsten Titer (K_9; Ak-Titer: 1 : 6000) lieferte nach der 2. Blutentnahme eine Eichkurve mit einer unteren Nachweisgrenze von ca. 4 pg/ml und einen 50-Prozent-Intercept von 124 pg/ml.

3.2.2.3. Direkte ACTH-Bestimmung im Serum mit den bei der Immunisierung erhaltenen Antiseren

Bereits von mehreren Autoren (11, 13, 45, 46, 56, 59) und auch in unserem Labor wurde auf die Probleme einer direkten ACTH-Bestimmung im Serum ohne vorherige Extraktion des Hormons hingewiesen.

Da die Extraktionsverfahren für ACTH jedoch aufwendig sind und wir, wie oben beschrieben, viele Antiseren mit hohen Titern gewinnen konnten (siehe Kap. 3.2.2.1.), wurde die Brauchbarkeit dieser Antiseren zur direkten ACTH-Bestimmung überprüft.

Dazu wurden Eichkurven erstellt (siehe Kap. 2.4.6. - 10.) und zugehörige Wiederfindekurven, bei denen die Standardkonzentrationen in ACTH-freiem Serum (siehe Kap.2.4.3.) gelöst wurden. Bei diesen Versuchen wurden die besten bei der Immunisierung erhaltenen Antiseren eingesetzt (siehe Kap. 3.2.2.2.).

Wenn die Antiseren zur direkten ACTH-Bestimmung geeignet wären, würde sich ein Zusammefallen beziehungsweise eine Parallelität zwischen den im Puffer und den im ACTH-freien Serum erstellten Eichkurven ergeben.

Dies war jedoch bei keinem einzigen Antiserum der Fall. Die mit den Antiseren K_{10} von der 3. Blutentnahme, K_5 und K_{11} von der 6. Blutentnahme sowie K_8 und K_{11} von der 7. Blutentnahme erstellten Eichkurven zeigten im Kurvenverlauf Überschneidungen. Auch das Antiserum K_5 von der 2. Blutentnahme lieferte keine parallelen Eichkurven (siehe Abb. 10). Mit zunehmenden ACTH-Standardkonzentrationen wurden bei diesen Eichkurven die Abweichungen im Verlauf immer größer, so daß sich ein scherenartiges Auseinanderklaffen der beiden Kurven ergab. Bei der im Serum durchgeführten Eichkurve wurde dabei im Vergleich zur Kurve im Puffer mit zunehmenden ACTH-Standardkonzentrationen weniger ACTH wiedergefunden.

Außerdem war die Serum-Standardkurve mit einer unteren Nachweisgrenze von ca. 34 pg/ml wesentlich unempfindlicher als die Standardkurve im Puffer (siehe Abb.10).

Weiter fiel auf, daß bei der im Serum durchgeführten Kurve die B_o-Werte um circa 6 % der Gesamtaktivität des Tracers niedriger lagen als bei der im Puffer erstellten Eichkurve.

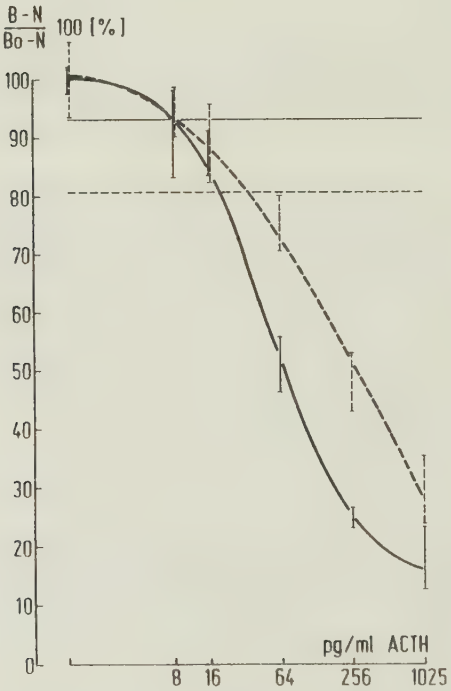


Abb. 10 : Direkte ACTH-Bestimmung im Serum

mit dem Antiserum K_5 von der 2. Blutentnahme

———— Pufferkurve

---------- Serumkurve

Als ACTH-Standard wurde Acethropan^R-S verwendet.

Die Versuche zeigen, daß unsere Antiseren zur direkten ACTH-Bestimmung ohne Extraktion nicht geeignet sind. Dies kann auf eine Bindung des ACTH an Serumproteine (56, 57, 58, 59) bzw. auf das Vorliegen von Störfaktoren zurückgeführt werden, die eine Bindung des ACTH an das Antiserum behindern (11, 13, 45). So konnten FEHM et al. (11) in radiochromatographischen Untersuchungen und in Extraktionsversuchen eine "binding activity" des Plasmas für ACTH nachweisen (siehe auch Kap.3.1.3. 3.).

3.2.2.4. Veränderung der Ak-Titer durch das Lyophilisieren der Antiseren

Da die Titer der bei -20°C eingefrorenen Antiseren im Laufe der Zeit eventuell abfallen könnten, wurde überprüft, ob sich durch ein Lyophilisieren der Seren die Höhe der Ak-Titer akut ändern würde.

Dazu wurden einige ml der Antiseren K_8 und K_{11} von der letzten Blutentnahme am 7. 3. 1977 sowie des Antiserum K_{11} von der 6. Blutentnahme am 1. 2. 1977 lyophilisiert. Anschließend wurden die Ak-Titer der lyophilisierten und nicht lyophilisierten Seren ausgetestet (siehe Kap. 2.3.6.) und miteinander verglichen.

Wir erhielten folgendes Ergebnis:

	Ak-Titer des nicht lyophilisierten Serums	Ak-Titer nach dem Lyophilisieren des Serums
K_8 : 7. Blutentnahme vom 7.3.77	1 : 32 000	1 : 32 000
K_{11} : 7. Blutentnahme vom 7.3.77	1 : 64 000	1 : 64 000
K_{11} : 6. Blutentnahme vom 1.2.77	1 : 128 000	1 : 96 000

Da durch das Lyophilisieren der Antiseren die Titer im allgemeinen nicht oder nur unwesentlich erniedrigt wurden, wurde ein Teil der Antiseren lyophilisiert aufbewahrt. Dadurch ist eine praktisch unbegrenzte Haltbarkeit der Seren bei Erhaltung eines hohen Ak-Titers wahrscheinlich.

3.2.3. Beurteilung der Eichkurven

Der Verlauf der Eichkurven mit den bei der Immunisierung erhaltenen Antiseren wurde bereits in Kap. 3.2.2.2. ausführlich beschrieben. Es seien hier nur kurz die im Laufe der Versuche mit den hauptsächlich verwendeten Antiseren erhaltenen Eichkurven charakterisiert.

Antiserum	Verdünnung	Zahl der Kurven	Untere Nachweisgrenze (pg/ml) Durchschnittswerte	50-Prozent-Intercept (pg/ml) Durchschnittswerte
Ak Ulm (K_{12})	1 : 7 000	5	12,8	124,4
Ak San Francisco	1 : 25 000	7	10,6	72,6
Ak 5 2.Blutentn.	1 : 50 000	10	8,9	71,0
Ak 10 3.Blutentn.	1 : 64 000	11	6,9	50,2

Als beste Ergebnisse wurden erhalten:

	Untere Nachweisgrenze (pg/ml)	50-Prozent-Intercept (pg/ml)
Ak Ulm	5,1	77,5
Ak San Francisco	2,5	50,2
Ak K_5	2,1	54,7
Ak K_{10}	2,7	20,9

Als Beispiel ist eine Standardkurve in Abb.11 dargestellt.

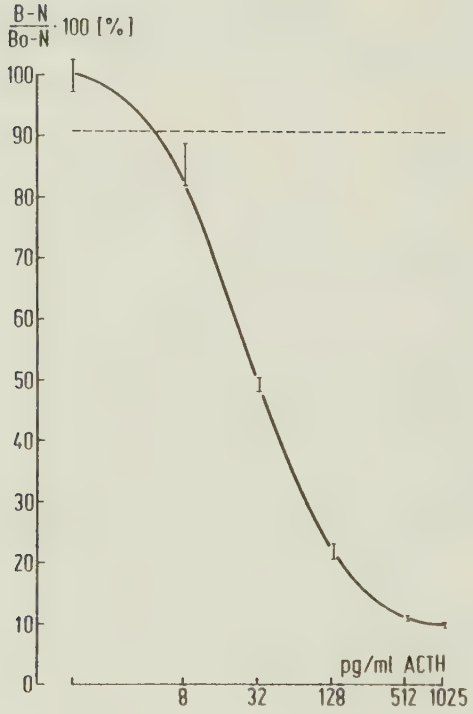


Abb. 11 : Standardkurve mit dem Antiserum K_{10} von der 3. Blutentnahme

Untere Nachweisgrenze: 4,3 pg/ml

50-Prozent-Intercept: 31,6 pg/ml

3.2.4. Vergleich der Eichkurven bei Verwendung verschiedener Standardpräparate

Beim ACTH unterscheidet man zwischen einem biologisch aktiven N-terminalen Ende (Aminosäuren 1 - 24) und einem biologisch nicht wirksamen C-terminalen Ende. Die Aminosäuren 25 - 32 des C-terminalen Endes besitzen antigene Potenz, die Aminosäuren 33 - 39 stellen eine wichtige Schutzfunktion gegen den enzymatischen Abbau des ACTH in vitro dar (56), der nach manchen Autoren (16, 29, 60) durch Plasmin induziert wird.

Da beim ACTH die biologische Wirkung im N-terminalen Peptidrest lokalisiert ist, wurden kurzkettige ACTH-Peptide (z.B. Acethropan^{R}-S) synthetisch hergestellt, die beim Fehlen des antigenen Anteils des Hormons die volle biologische Wirkung besitzen.

Im folgenden Versuch wurden Eichkurven erstellt, wobei zum Vergleich als Standardpräparate h-ACTH$_{1-39}$, Acethropan^{R}-S, sowie Porcine-ACTH verwendet wurden (siehe Kap. 2.1.1.). Als Antiserum wurde K_5 von der 2. Blutentnahme in einer Verdünnung von 1 : 50 000 eingesetzt.

Die mit den Standardpräparaten h-ACTH$_{1-39}$ und Acethropan^{R}-S erstellten Eichkurven zeigten nur sehr geringe Unterschiede in ihrem Verlauf (siehe Abb. 12). Der 50-Prozent-Intercept betrug bei der Verwendung von

h-ACTH$_{1-39}$ 79,9 pg/ml, bei der Verwendung von Acethropan^{R}-S 82,0 pg/ml. Da wegen der Verwendung von Acethropan^{R}-S als Antigen bei der Immunisierung das Antiserum nur gegen die ersten 23 Aminosäuren des vollständigen ACTH-Peptids gerichtet ist, würde man theoretisch bei der Verwendung von Acethropan^{R}-S als Standardpräparat eine steilere Eichkurve erwarten. Wegen des geringeren Molekulargewichts von Acethropan^{R}-S im Vergleich zum vollständigen Hormon müßten pro Gewichtseinheit mehr Moleküle vorhanden sein, die mit dem Antiserum reagieren könnten.

Daher wurde zur Überprüfung des Ergebnisses ein 2. Versuch durchgeführt, bei dem sich auch nur geringe Unterschiede im Kurvenverlauf bei der Verwendung der Standardpräparate h-ACTH$_{1-39}$ und Acethropan^{R}-S ergaben, und somit das Ergebnis bestätigt wurde.

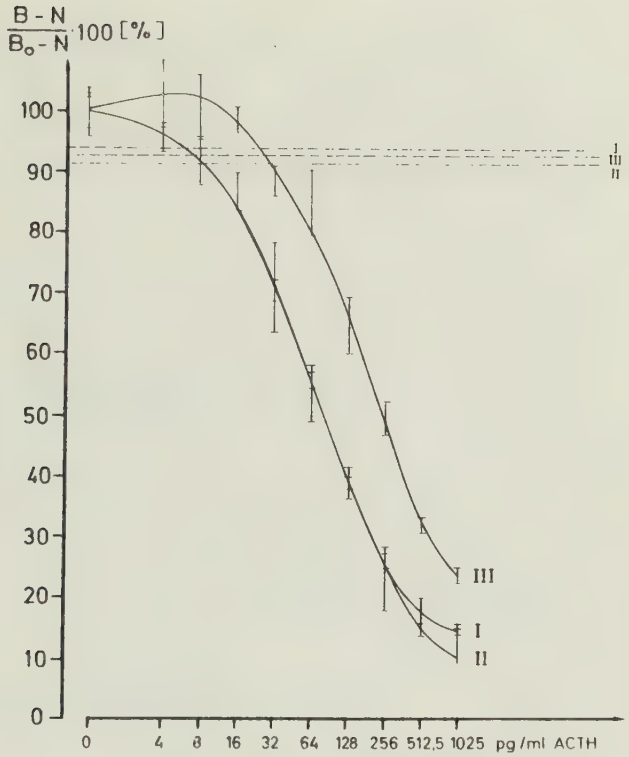


Abb. 12 : Eichkurven bei Verwendung verschiedener Standardpräparate

I $ß_{1-23}$ Corticotropinamid (Acethropan^{R}-S)

II h-$ACTH_{1-39}$

III Porcine-ACTH

Der flachere Kurvenverlauf der mit Porcine-ACTH ausgeführten Eichkurve - untere Nachweisgrenze: 25,5 pg/ml, 50-Prozent-Intercept: 241 pg/ml - könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, daß dieses ACTH-Präparat nicht ganz rein extrahiert werden konnte, so daß in der Gewichtseinheit weniger ACTH-Moleküle vorhanden waren. (Im Gegensatz zum synthetische h-$ACTH_{1-39}$ und Acethropan^{R}-S handelt es sich um ein aus Schweinehypophysen extrahiertes ACTH-Präparat, siehe Kap. 2.1.1.)
Die unterschiedliche Aminosäuresequenz gegenüber dem menschlichen ACTH - in der Position 31 - dürfte sich auf den Eichkurvenverlauf nicht auswirken; denn der biologisch aktive Anteil des ACTH weist bei den verschiedenen untersuchten Species (Mensch, Rind, Schaf, Schwein) keine Unterschiede auf, und das verwendete Antiserum ist nur gegen den biologisch wirksamen Anteil des ACTH gerichtet.

3.2.5. Beurteilung der Extraktionsmethode

Aufgrund der in Kap. 3.1.3.1.-5. beschriebenen Vorversuche wurde die Extraktion mit Kieselgelsäulen folgendermaßen durchgeführt (siehe auch Kap. 2.4.4. 2.): Zunächst wurden die Serum- bzw. Standardproben mit 0,1 n HCl auf einen pH-Bereich von 4,2 - 4,5 eingestellt. Dann wurde je 1 ml der jeweiligen Proben auf die Säulen aufgetragen und mit je 2 ml 0,1 m Natriumphosphatpuffer pH 4,2 - 4,5 und 2 ml 0,2 n HCl gespült. Die Elution des adsorbierten ACTH erfolgte mit 3 ml eines 50 %igen Aceton-Wassergemisches. Das Elutionsprofil einer Extraktion ist in Abb.13 dargestellt.

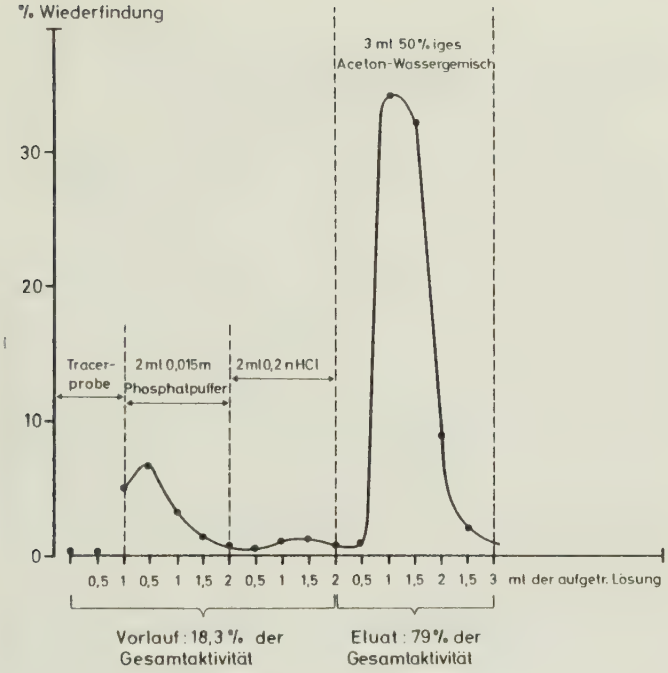


Abb. 13 : Elutionsprofil einer Extraktion

Bei einer Extraktion von Tracerproben (n = 23) wurde innerhalb desselben Versuchs unter den gleichen Bedingungen eine Wiederfindung von 75,0 $\pm$ 3,0 % ($\bar{x} \pm s$) der Gesamtaktivität erhalten.

Bei einer zufälligen Auswahl von 10 verschiedenen mit dieser Methode durchgeführten Extraktionen wurde eine Wiederfindung von 74,8 $\pm$ 6,5 % ($\bar{x} \pm s$) der eingesetzten ACTH-Menge festgestellt.

3.2.6. Anwendung des Extraktionsverfahrens im RIA

Das Extraktionsverfahren wurde im RIA und in einem BIO-Assay (IAC-Assay, 2, 30, 44) eingesetzt.

Wie bereits in Kap. 3.1.4.2. beschrieben, bereitete das Abfallen der pH-Werte nach die Wiederaufnahme der eingeengten Proben in Puffer ein wesentliches Problem dieses Extraktionsverfahrens. Zur Umgehung dieser Schwierigkeit wurden verschiedene Methoden angewendet. Zunächst wurden die Proben nach dem Einengen in je 1 ml 0,05 m Veronalpuffer pH 8,0 aufgenommen und mit einer nicht extrahierten Vergleichsstandardkurve im pH-Bereich 7,7 im RIA eingesetzt. Dabei zeigte sich anhand einiger Versuche, daß keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten wurden. Insbesondere wichen einige Standardkonzentrationen der extrahierten Eichkurve bei manchen Versuchen erheblich von dem zu erwartenden Eichkurvenverlauf ab. Das war darauf zurückzuführen, daß die pH-Werte bei diesen Proben weit unter den erwarteten pH-Bereich von ca. 7,7 abgefallen waren (siehe auch Kap. 3.1.4.2.).

Bei einer weiteren Versuchsserie wurden die pH-Werte aller Proben nach dem Einengen und der Wiederaufnahme in Puffer gemessen, und gegebenenfalls auf einen pH-Wert von ca. 7,7 umgepuffert. Hierzu wurden im allgemeinen zwischen 5 - 40 µl 0,1 n NaOH benötigt, wodurch sich geringe Volumenveränderungen der Proben ergaben. Mit dieser Methode ließ sich ein völliges Ab-

weichen einiger Standardpunkte vom Eichkurvenverlauf vermeiden, es konnte jedoch auch keine vollständige Parallelität zwischen der im Puffer durchgeführten und der extrahierten Standardkurve erhalten werden. Bei Proben, bei denen die pH-Werte sehr stark abgefallen waren, verlief die extrahierte Eichkurve wesentlich flacher als die zugehörige Pufferkurve, obwohl bei der Extraktion keine im Vergleich zu anderen Versuchen geringere Wiederfindung festgestellt worden war. Das kann möglicherweise damit erklärt werden, daß das Umpuffern der Proben eine Molaritätsänderung bewirkt, die nach dem in Kap. 3.1.4.4. beschriebenen Versuch eine Veränderung des Eichkurvenverlaufs zur Folge hat. Je nach der Konzentration der jeweils zugefügten Natronlauge könnte sich eine jeweils unterschiedliche Lage der einzelnen Standardkurvenpunkte der extrahierten Eichkurve bzw. der Serumproben ergeben. Aus diesem Grunde und wegen der Volumenveränderung der Proben und des großen Arbeitsaufwandes erwies sich ein Umpuffern der Proben als ungünstig.

Bei einer 3. Versuchsserie wurden höhermolare Puffer verwendet, wobei mit 0,09 m Veronalpuffer, 0,2 m und 0,4 m Phosphatpuffer relativ gute Ergebnisse erhalten wurden. Die Wiederfindung betrug im steilen Eichkurvenbereich (extrahierte Proben abgelesen an den Proben einer Standardkurve im Puffer) 70,5 $\pm$ 9,4 % ($\bar{x}$ $\pm$ s; n = 12).

Um eventuell die Reproduzierbarkeit unserer Versuche zu verbessern, wurde der Einfluß von Trasylol^{R} auf die Serumproben untersucht. Trasylol^{R} verhindert durch Inaktivierung proteolytischer Enzyme eine Zerstörung des ACTH im Plasma (2, 4, 5, 32, 66). X.BAUR (2) fand z. B., daß im IAC-Assay nach SAYERS et al. (44) durch Zusatz von 5 - 100 KIE Trasylol^{R} pro Serumprobe die gemessenen ACTH-Aktivitäten in Abhängigkeit von der zugefügten Trasylol^{R}-Menge anstiegen. Bei unserem Versuch wurden den Serumproben vor der Extraktion 400 KIE/ml Trasylol^{R} zugegeben, das entsprach dem Trasylol^{R}-Zusatz zum Puffer. Bei dieser Versuchsanordnung wurden jedoch keine signifikanten Veränderungen gegenüber Versuchen ohne Trasylol^{R}-Zusatz festgestellt.

Eine systematische Untersuchung des Einflusses von Trasylol^{R} auf die Serumprobe durch Zugabe verschiedener Trasylol^{R}-Mengen wurde von uns jedoch nicht durchgeführt.

Die schlechte Reproduzierbarkeit der Extraktionsversuche ist wohl in erster Linie auf die dabei aufgetretenen technischen Probleme zurückzuführen.
Es war z.B. ein sehr sorgfältiges Präparieren der Säulen erforderlich, um eine bei allen Proben annähernd konstante Laufgeschwindigkeit zu erreichen. Es mußte auch darauf geachtet werden, daß kein Kieselgel bei der Elution des ACTH mit in die silikonisierten Röhrchen gelangte und so als Störfaktor im RIA wirkte.

Ein weiteres wesentliches Problem stellte das Einengen der Proben im Rotationsverdampfer dar. Die Dauer des Einengens war von der Höhe des jeweiligen Wasserdrucks abhängig und variierte von Versuch zu Versuch in erheblichem Ausmaß. Es mußte darauf geachtet werden, ein Herausspritzen des Acetons aus den Röhrchen - was bei zu hohem Druck leicht möglich war - während des Einengens zu verhindern.

Da sich nach dem Einengen bei manchen Proben ein schwer lösbarer Bodensatz bildete, bereitete auch das Aufschütteln der Proben Schwierigkeiten.
Bei manchen Proben wurde - insbesondere bei der Verwendung des "Vortex Evaporators" zum Einengen - nach der Wiederaufnahme der Proben in Puffer eine Schlierenbildung beobachtet.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß eine Extraktion mittels Kieselgelsäulen prinzipiell möglich, die von uns durchgeführte Methode jedoch sehr arbeitsaufwendig und aufgrund technischer Schwierigkeiten schlecht reproduzierbar ist.

4. DISKUSSION

Von den zahlreichen Schwierigkeiten der radioimmunologischen ACTH-Bestimmung (siehe EINLEITUNG) stehen zwei Hauptprobleme besonders im Vordergrund. Hierbei handelt es sich erstens um Störfaktoren im Serum, die eine Bindung des ACTH an das Antiserum behindern, und zweitens um die geringe antigene Potenz des Hormons, die die Gewinnung spezifischer und empfindlicher Antiseren erschwert.

Wie bereits mehrfach in dieser Schrift erwähnt, konnten v.WERDER et al. (56, 57, 58, 59) 1968 mittels Dextrangelfiltration und Dichtegradientenzentrifugation mit Tritium markierten $ß_{1-23}$-Corticotropin nachweisen, daß ein relativ großer Anteil des ACTH im Serum an Proteine gebunden ist. Ein spezifisches ACTH-bindendes Protein wurde allerdings bisher nicht beschrieben.
Nach den Untersuchungen von v.WERDER et al. (56, 57, 58, 59) ist die Serumproteinbindung des ACTH durch die Albuminfraktion bedingt. FEHM et al. (11) konnten in radiochromatographischen Untersuchungen und in Extraktionsversuchen nachweisen, daß ACTH im Serum an eine Substanz mit hohem Molekulargewicht gebunden wird. Die Bindung an diesen "binding factor" war dabei von Serum zu Serum unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies erklärt, daß eine direkte Bestimmung des ACTH im Serum, wie sie für zahlreiche andere Hormone angewandt wird, relativ problematisch ist.

Dies wurde auch bereits früher in unserem Labor (9) anhand eines Antiserums nachgewiesen, das uns aus Marseille (Prof. Depieds) zur Verfügung gestellt worden war. EHBAUER (9) zeigte bei Einsatz dieses Antiserums eine Reihe von Störmöglichkeiten der direkten ACTH-Bestimmung auf. So wurden z. B. enorme Schwankungen der Werte bei gleichen Seren zwischen verschiedenen Bestimmungen festgestellt. Auch lagen die Verdünnungswerte von einzelnen Seren nicht immer auf der Eichkurve, d.h. Serumverdünnungen und Standardeichkurve liefen nicht parallel (9). Auch die zahlreichen, im Laufe unseres Immunisierungsprogramms erhaltenen Antiseren waren trotz der zum Teil sehr hohen Titer für eine direkte ACTH-Bestimmung ungeeignet.

So waren die Standardkurven im Serum in keinem einzigen Fall zu der zugehörigen Puffer-Standardkurve parallel und stets wesentlich unempfindlicher. Eine Extraktion des ACTH aus dem Serum war daher unbedingt erforderlich.

Von den zahlreichen bereits in der EINLEITUNG kurz erwähnten Extraktionsmethoden für ACTH (7, 19, 31, 37, 40, 41, 45, 46, 61, 62) werden heute hauptsächlich die angewendet, die auf einer Adsorption des ACTH an Quso G 32 oder Kieselgel beruhen (11, 13, 22). Bereits früher (2) war in unserem Labor eine von GIORDANO und SAYERS (13) beschriebene Extraktions-

methode ausgetestet worden, bei der ACTH an Quso G 32 adsorbiert und mit 0,9 % NaCl-0,1 n HCl wieder von Quso eluiert wurde. Als Nachteil dieser Methode erwies sich, daß sich das sedimentierte Quso nur schwer wieder aufschütteln ließ, so daß - statt der von GIORDANO und SAYERS angegebenen 5 min - bis zu 15 min auf einem Whirlmix geschüttelt werden mußte (2). Die schlechte Löslichkeit von Quso G 32 wurde auch bei der Reinigung unseres Tracers beobachtet (siehe Kap. 2.2.3.). Die Extraktion einer größeren Probenzahl ist also mit dieser Methode mit erheblichem Zeitaufwand verbunden.

Als weiterer Nachteil der Quso-Extraktion sind Elutionsschwierigkeiten zu nennen. Bei der Reinigung unseres Tracers mit Quso G 32 stellten wir fest, daß durchschnittlich (Werte von 12 Markierungen) 38 % des markierten und an 5 mg Quso adsorbierten ACTH (siehe Kap. 2.2.3. und 3.2.1.) wieder vom Quso eluiert wurden, wobei die Ausbeute hier zwischen 20 % und 65 % schwankte.Auch bei den früher in unserem Labor durchgeführten Untersuchungen (2, 13) war bereits eine unvollständige Elution des ACTH vom Quso beschrieben worden. Außerdem konnte keine vollständige Abtrennung von den Störfaktoren des Serums, dem "binding factor" (FEHM, 11) bzw. "ACTH-inhibiting-factor" (SAYERS, 13, 45) mit der oben beschriebenen Methode erreicht werden (2).

FEHM et al. (11) zeigten durch Untersuchungen mit Tracer, daß die prozentuale ACTH-Wiederfindung bei einer Extraktion mit Quso zwar im selben Plasma für alle zugefügten ACTH-Konzentrationen gleich groß war, daß aber der ACTH-Anteil, der mit Quso extrahiert werden konnte, von Plasma zu Plasma erheblich schwankte. Dies wurde von FEHM et al. auf die bei verschiedenen Seren unterschiedlich hohe "binding activity" für ACTH zurückgeführt.

Da sich also eine Extraktion mit Quso als ungünstig erwies, wurde von uns in Anlehnung an ein von LIOTTA und KRIEGER (22) beschriebenes Extraktionsverfahren eine Extraktionsmethode mit Kieselgelsäulen ausgearbeitet.

Im Gegensatz zur Quso-Extraktion konnten wir große Schwankungen in der Wiederfindung bei der Verwendung verschiedener Seren bei der Extraktion mit Kieselgel nicht feststellen. So betrug die Wiederfindung (gemessen mit Tracerproben: 900 µl ACTH-freies Serum + 100 µl einer Tracerverdünnung; siehe Kap. 2.4.4.2.) bei 10 verschiedenen mit dieser Methode durchgeführten Extraktionen 74,8 $\pm$ 6,5 % ($\bar{x} \pm s$). Man kann also annehmen, daß Kieselgel zur Extraktion von ACTH aus dem Serum geeignet ist.

Die Nachteile unserer Extraktionsmethode wurden bereits ausführlich in Kap. 3.2.6. dargestellt. Hier

wären in erster Linie der sehr große Arbeitsaufwand zu nennen - z.B. mußten vor jedem Versuch die Säulen neu hergestellt werden -, außerdem konnten technische Probleme der Methode nicht beseitigt werden. So bereitete insbesondere das Einengen der Proben durch Evaporation große Schwierigkeiten und führte zur Ungenauigkeit und ungenügender Reproduzierbarkeit der Extraktionsversuche.

Im folgenden soll noch auf das zweite Problem der radioimmunologischen ACTH-Bestimmung, nämlich auf die Gewinnung empfindlicher ACTH-Antiseren, eingegangen werden.,

Aufgrund der Ergebnisse von SKOWSKY und FISHER (49) verwendeten wir bei der Immunisierung als Trägerprotein Thyreoglobulin, ein in der Schilddrüse synthetisiertes Glykoproteid, das pro Molekül 125 Tyrosinreste enthält.

Thyreoglobulin wurde erstmals 1971 von CHOPRA und NELSON (6) mit gutem Erfolg als Antigen zur Gewinnung von Antiseren gegen T_3 und T_4 eingesetzt.

SKOWSKY und FISHER (49) führten 1972 ein umfangreiches Immunisierungsprogramm zur Gewinnung von Antiseren gegen Parathormon und Vasopressin durch. Dabei wurden als Trägerproteine Rinderserumalbumin, Schafalbumin, Humanalbumin, Polylysin, Poly-Glutaminsäure,

langkettiges Poly-D, L-Alanyl-Poly-L-Lysin sowie Thyreoglobulin eingesetzt. Antiseren wurden lediglich bei der Koppelung von LVP an Humanalbumin und Tg, sowie bei der Koppelung von PTH an Tg erhalten. Bei der Verwendung von Tg konnte bei 100 % der immunisierten Versuchstiere ein Antiserum gewonnen werden, bei der Verwendung von Humanalbumin dagegen nur bei 75 %.

Mit allen anderen LVP- bzw. PTH-Präparationen konnte bei der Immunisierung von insgesamt 70 Versuchstieren bei keinem einzigen Tier ein Antiserum-Titer $>$ 1 : 100 erzielt werden. Beim Einsatz des LVP-Tg-Konjugates lagen die Titer dagegen 30 Wochen nach der Erstimmunisierung bei einer Tracerbindung von 50 % bei 1 : 60 000 (Endverdünnung des Antiserums), beim Einsatz des LVP-Humanalbumin-Konjugates wurden dagegen nur Titer $\leq$ 1 : 10 000 erhalten.

Bei früher in unserem Labor durchgeführten Immunisierungen konnten mit einem Corticotropin-Zink-Komplex (9) sowie mit hochgereinigtem Schweine-ACTH (56) keine geeigneten Antiseren gewonnen werden. Auch bei anderen Autoren erwies sich die Verwendung dieses Antigen-Komplexes (35) bzw. Antigens (8) als problematisch (36) (siehe EINLEITUNG). Durch Koppelung von ACTH an Tg wurde dagegen bei allen 12 immunisierten Kaninchen eine Immunantwort hervorgerufen. Bei allen Tieren, die die 4. Boosterung überlebt hatten, wurden dabei bei mehreren Blutentnahmen sehr hohe Titer er-

halten, wobei 3 Kaninchen Ak-Titer ≥ 1 : 150 000 bei einer Tracerbindung von 30 % (Endverdünnung des Antiserums) aufwiesen.

Die Antiseren sämtlicher Kaninchen, die die 4. Boosterung überlebt hatten, waren dabei nach einer oder mehreren Blutentnahmen zur Herstellung von Standardkurven für einen ACTH-RIA gut geeignet. Mit den Antiseren mit den höchsten Titern wurden Standardkurven mit einer unteren Nachweisgrenze von durchschnittlich ca. 7 pg/ml, in günstigen Fällen von ca. 2 pg/ml erhalten. Der 50-Prozent-Intercept betrug dabei ca. 50 - 70 pg/ml (siehe Kap. 3.2.3.). Aber auch Antiseren mit niedrigeren Titern waren zur Herstellung von Standardkurven gut geeignet. So wurde z.B. mit dem Antiserum K_9 (Ak-Titer: 1 : 20 000 bei 30 % Tracerbindung, in der Endverdünnung) eine Eichkurve mit einer unteren Nachweisgrenze von ca. 4 pg/ml erhalten.

Es stellt sich hier die Frage, welche Eigenschaften des Thyreoglobulins die hohe Ausbeute und die Qualität der Antiseren bedingen.

Um diese Frage zu klären, wurden bereits von SKOWSKY und FISHER (49) Untersuchungen durchgeführt, die nachfolgend kurz dargestellt werden sollen.

Eine Koppelung von Haptenen an Trägerproteine mittels Carbodiimid kann nur zwischen aktivierten Carboxyl- und Aminogruppen vollzogen werden (siehe METHODEN). Daher können praktisch nur Aspargin- bzw. Glutaminsäurereste mit Lysin- bzw. Argininresten reagieren.

Tg enthält ungefähr 500 (51, 52) Arginin- und Lysininreste und etwa 1100 Glutaminsäure- und Asparginsäurereste pro Molekül (51, 52). Im Vergleich dazu enthält Albumin nur 118 Aspargin- und Glutaminsäurereste und 73 Lysin- und Argininreste, Polylysin enthält insgesamt etwa 1096 Moleküle dieser 4 Aminosäuren.

Obwohl nicht bekannt ist, welcher Prozentsatz dieser Aminosäurereste eine Bindung eingeht, kann dennoch angenommen werden, daß eine relativ große Zahl von Hapten-Molekülen an Tg gekoppelt werden kann. Bei den von SKOWSKY und FISHER (49) durchgeführten Untersuchungen konnten in ein Tg-Molekül durchschnittlich ca. 50 Moleküle des Haptens eingebaut werden, dagegen konnten z. B. an Polylysin als Carrier nur 3 Moleküle Vasopressin gekoppelt werden. Durch diese Tatsache allein kann jedoch die hohe Antigenität des Tg nicht erklärt werden, da Carrierproteine, an die eine weit größere Zahl von Haptenmolekülen gekoppelt werden konnte - das molare Verhältnis Hapten : Trägerprotein betrug 160 : 1 - überhaupt keine antigene Wirkung besaßen.

Nach SKOWSKY und FISHER (49) ist die antigene Wirkung des Tg auch nicht von der Antigenmenge, dem Immunisierungsschema oder der Art der Versuchstiere abhängig. Wir verwendeten eine relativ geringe Antigenmenge und konnten bei der Immunisierung verschiedener Kaninchenstämme keine Unterschiede in der Ausbeute und Qualität der Antiseren feststellen.

ARNON und SELA (1) zeigten, daß die Anreicherung eines schwachen Antigens mit 2 % Tyrosinresten die Antigenität der Substanz erheblich steigerte.
Da der Tyrosingehalt von Tg (2,3 %) dem von Rinderserumalbumin (4,5 %) und Schafalbumin (3,6 %) ähnlich ist, erklärt dies allerdings auch nicht die größere antigene Potenz des Tg.

WEIGLE, HIGH und NAKAMURA (55) zeigten, daß Kaninchen-Tg im kompletten Freund'schen Adjuvans in vivo verändert wird und erworbene Immunmangelzustände bei Kaninchen beseitigen kann. Möglicherweise ist der proteolytische Zerfall des Tg in kleinere Bruchstücke für die hohe Antigenität verantwortlich.

Von SELA (48) wurde vermutet, daß die antigene Potenz eines Carrierproteins in direktem Zusammenhang zur Stabilität in vivo steht. Möglicherweise wird Tg als großes Molekül mit zahlreichen intramolekularen Peptidbrücken langsam in den Versuchstieren abgebaut.

Bisher ist nicht endgültig geklärt, welche Eigenschaft des Tg die Produktion von Antiseren bei den Versuchstieren hervorruft; Tg hat sich jedoch bei allen bisher untersuchten Hormonen als Trägerprotein zur Gewinnung empfindlicher und spezifischer Antiseren bewährt (49, 50).

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Gewinnung von Antiseren gegen ACTH wurde synthetisches $ß_{1-23}$ Corticotropin-amid(Acethropan^{R}-S) mittels Carbodiimid an Rinder-Thyreoglobulin gekoppelt. Bei der Immunisierung von 12 Kaninchen bildeten alle Tiere, die die 4. Boosterung überlebt hatten, Antiseren, die zur Verwendung im RIA geeignet waren. Nach der 3. Boosterung war der Ak-Titer bei 4 Kaninchen bei einer Tracerbindung von ca. 30 % $\geq$ 1 : 50 000 (Endverdünnung des Antiserums), nach der 4. Boosterung war der Ak-Titer von 3 Kaninchen $\geq$ 1 : 100 000. Nach der 8. Boosterung zeigten 2 Kaninchen Ak-Titer $\geq$ 1 : 300 000. Der niedrigste Ak-Titer der Kaninchen, die die 4. Boosterung überlebt hatten, lag bei 1 : 20 000 (Endverdünnung des Antiserums). Die Höhe der Ak-Titer wurde durch das Lyophilisieren der Seren nicht oder nur unwesentlich vermindert. Daher wurde ein Teil der Antiseren lyophilisiert aufbewahrt.

2. Bei der radioaktiven Markierung wurde 0,5 µg h-$ACTH_{1-39}$ mit 0,5 mCi ^{125}J nach der Chloramin T-Methode markiert und durch eine Extraktion mit Quso G 32 gereinigt. Bei der Verwendung von Tracern mit den spezifischen Aktivitäten 1820, 920 und 240 mCi/mg zur Herstellung von Standardkurven wurden nur sehr geringe Unterschiede in der Empfindlichkeit und Steilheit der Standardkurven festgestellt. Die Tracer wurden unmittelbar nach

der Markierung konzentriert eingefroren und vor jeder Verwendung nachgereinigt, da hiermit auch bei relativ langer Aufbewahrung des Tracers ausreichend hohe B_o-Werte und eine relativ niedrige unspezifische Bindung erhalten wurden, was mehrfach überprüft wurde.

3. Um eine ausreichende Empfindlichkeit des Assays zu erreichen, wurden die Antiseren in einer Verdünnung eingesetzt, in der bei Fehlen von kaltem Hormon ca. 30 % des Tracers gebunden wurden. Die Bound/Free-Trennung erfolgte mit der Doppelantikörpermethode. Für jede Charge des 2. Antikörpers - Anti-Kaninchen-γ-Globulin vom Esel (Fa.Wellcome) - wurde die optimale Verdünnung neu ausgetestet.

4. Es wurden die Inkubationszeiten untersucht. Bei einer gesamten Inkubationszeit von ca. 24 Stunden wurde keine ausreichend empfindliche Standardkurve erhalten. Eine kalte Vorinkubation sowie die Verlängerung der Inkubationszeit nach der Zugabe des Tracers führte zur größeren Empfindlichkeit. Bei der Inkubationskinetik des Antiserums zeigte sich bis zu einer Inkubationszeit von ca. 24 h ein steiler Anstieg der Bindung $\frac{B_o}{T}$. Bei weiterer Verlängerung der Inkubationszeit wurde der Anstieg der Bindung $\frac{B_o}{T}$ flacher, es wurde allerdings auch nach 48 h noch kein Plateau in der Höhe der B_o-Werte erhalten.

Bei der Inkubation des 2. Antikörpers stellte sich bereits nach ca. 1 Stunde ein Plateau in der Bindung des Tracers an das Antiserum ein.

5. Die Versuche wurden nach folgendem Pipettier- und Inkubationsschema durchgeführt:
300 µl ACTH-Standard bzw. Serumprobe wurden zusammen mit 200 µl Antiserumverdünnung ca. 24 Stunden vorinkubiert. Danach folgte die Zugabe von 100 µl Tracer pro Probe, worin 7 µg Kaninchen-γ-Globulin enthalten waren. Nach einer weiteren Inkubation von ca. 24 Stunden erfolgte die Zugabe von 100 µl Anti-Kaninchen-γ-Globulin vom Esel (Fa. Wellcome) in der ausgetesteten Verdünnung. Nach einer weiteren Inkubation von 1 - 2 Stunden erfolgte die Bound-Free-Trennung durch Zentrifugation von 10 min bei 4°C mit ca. 2000 g.

Die Zählergebnisse wurden auf Lochstreifen erfaßt und in einer EDV-Anlage nach dem Prinzip der spline-Approximation ausgewertet.

Bei der Verwendung der bei der Immunisierung erhaltenen Antiseren wurden Eichkurven mit einer unteren Nachweisgrenze von ca. 7 pg/ml und einem 50-Prozent-Intercept von durchschnittlich 50 - 70 pg/ml erhalten. Die besten Ergebnisse waren: Untere Nachweisgrenze 2,7 pg/ml, 50-Prozent-Intercept 20,9 pg/ml.

6. Es wurde die Verwendbarkeit der Antiseren zur direkten ACTH-Bestimmung im Serum überprüft. Alle untersuchten Antiseren waren ungeeignet, wobei z.T. Überschneidungen zwischen der Puffer- und Serumkurve, z.T. ein scherenartiges Auseinanderklaffen beobachtet wurde.

7. In Anlehnung an ein von LIOTTA und KRIEGER beschriebenes Extraktionsverfahren wurde eine Extraktionsmethode mit Kieselgelsäulen ausgearbeitet. Die Extraktion erfolgte im pH-Bereich 4,2 - 4,5. Je 1 ml der Standard- bzw. Serumproben wurden auf die Säulen aufgetragen und mit je 2 ml 0,1 m Na-Citratpuffer pH 4,2 - 4,5 und mit 2 ml 0,2 n HCl gespült. Die Elution erfolgte mit 3 ml eines 50 %igen Aceton-Wassergemischs. Die Wiederfindung betrug in zehn verschiedenen Versuchen 74,8 $\pm$ 6,5 % ($\bar{x} \pm s$).

   Die Proben wurden anschließend in einem Rotationsverdampfer bzw. "Vortex Evaporator" eingeengt und in je 1 ml Puffer wieder aufgenommen.

8. Da die pH-Werte der Proben nach der Wiederaufnahme im Puffer abfielen und die Proben z.T. mit 0,1 n NaOH umgepuffert wurden, wurde die Abhängigkeit des Verlaufs der Eichkurven vom pH-Wert und der Molarität des verwendeten Puffers untersucht. Hierbei wurde z.T. eine erhebliche Veränderung des Eichkurvenverlaufs durch Variation des pH-Wertes bzw. der Molarität beobachtet.

Standardkurven im pH-Bereich 7 - 8 waren praktisch identisch aber völlig von denen im pH-Bereich 8 - 9 verschieden.

9. Es wurde ein Vergleich von Eichkurven bei Verwendung der Standardpräparate h-$ACTH_{1-39}$, $ß_{1-23}$ Corticotropin-amid (Acethropan^{R}-S) sowie Porcine-ACTH durchgeführt. Bei der Verwendung von $ß_{1-23}$ Corticotropin-amid und h-$ACTH_{1-39}$ wurden annähernd identische Eichkurven erhalten, die Eichkurve bei der Verwendung von Porcine ACTH war unempfindlicher und verlief nach rechts versetzt, d. h. flacher.

10. Es wurden die Ergebnisse, insbesondere die gute Eignung von Thyreoglobulin als Trägerprotein zur Gewinnung von Antiseren gegen Peptidhormone diskutiert.

6. LITERATUR

1. ARNON, R. and M. SELA:
Studies of the chemical basis on the antigenicity of protein
Biochem. J. 75: 103-109, 1960

2. BAUR, X.:
Zur Problematik der biologischen ACTH-Bestimmung in vivo und in vitro
Inauguraldissertation, Universität München (1974)

3. BERSON, S. A. and R. S. YALOW:
Radioimmunoassay of ACTH in Plasma
J. Clin. Invest. 47, 2725-2751

4. BERSON, S. A. and R. S. YALOW:
Introduction of the Symposium on Radioimmunoassay. General Principle. In:
7th International Congress of Clinical Chemistry, Genf 1969.
Eds.: J. P. Felber and J. J. Scheidegger;
S. Karger, Basel 1970, Vol. 3, p. 89

5. BESSER, G. M., D. N. ORTH, W. E. NICHOLSON, R. L. BYYNY, K. ABE and J. P. WOODHAM:
Dissociation of the disappearance of bioactive and radioimmunoreactive ACTH from plasma in man
J. Clin. Endocr. 32, 595 (1971)

6. CHOPRA, J., J. C. NELSON, D. H. SOLOMON et al.:
Production of antibodies specifically bindung triiodothyronine and thyroxine
J. Clin.Endocrinol. Metab. 32: 299-308,1971

7. DAVIS, B. M. A.:
Blood corticotrophin in normal adults and in patients with cushing's syndrome
Acta andocrin. (Kbh.) 45, 55 (1964)

8. DEMURA, H., C. D. WEST, C. A. NUGENT, K. NAKAGAWA and F. H. TYLER:
A sensitive radioimmunoassay for plasma ACTH levels
J. Clin. Endocrinol. Metab. 26, 1297-1302 (1966)

9. EHBAUER, M.:
Dissertation in Vorbereitung

10. ERHARDT, F., I. MARSCHNER, R. C. PICKARDT and P. C. SCRIBA:
Verbesserung und Qualitätskontrolle der radioimmunologischen Thyreotropin-Bestimmung
Zeitschrift für Klin.Chemie und Klin. Biochemie 11.Jg. 1973, S. 381-387

11. FEHM, H. L., K. H. VOIGT and E. F. PFEIFFER:
Problems and artefacts in ACTH-assay
Horm. Metab. Res. 4, 477 (1972)

12. FEHM, H. L., K. H. VOIGT, R. LANG, M. B. ÖZYOL and E. F. PFEIFFER:
Influence of plasma on ACTH stimulated corticosterone production of isolated adrenal cells
FEBS Letters 36, 109 (1973)

13. GIORDANO, W. D. and G. SAYERS:
Isolated adrenal cells: Assay of ACTH in Rat Serum
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 136, 623 (1971)

14. GIRARD, G. and V. K. VANCE:
Modification of Lipscomb-Nelson bioassay for ACTH
Endocrinology 71, 325 (1962)

15. McGUIRE, J., R. McGILL, S. LEEMAN and T. GOODFRIEND:
The experimental generation of antibodies to α-MSH and ACTH
J. Clin.Invest. 44, 1672-1678 (1965)

16. HOPKINS, T. F., C. TERNER and G. PINCUS:
Preparation and properties of the cofactor of an ACTH-inactivating enzyme-system from human blood
Endocr. 69, 728 (1961)

17. HORN, K., J. HENNER, O. A. MÜLLER and P. C. SCRIBA:
Mechanisierte Hormonanalytik mittels simultaner Säulenchromatographie
Zeitschrift f. Klin. Chemie und Klin. Biochemie, 13. Jg., 1975, S.173-178

18. HUNTER, W. M. and F. C. GREENWOOD (1962):
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity
Nature (London) 194, 495

19. ISLAND, D. P., N. SHIMIZU, W. E. NICHOLSON, K. ABE, E. OGATA and G. W. LIDDLE:
A method for separating small quantities of MSH and ACTH with good recovery of each
J. Clin. Endocr. 25, 975 (1965)

20. LANDON, J. and F. C. GREENWOOD:
Homologous radioimmunoassay for plasma-levels of corticotrophin in man
Lancet I, 273-276 (1968)

21. LINDNER:
Chemistry of Steroid Haptens
39-40

22, LIOTTA, A. and T. D. KRIEGER:
A sensitive Bioassay for the Determination of Human Plasma ACTH levels
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 268 (1975)

23. LIPSCOMB, N. S. and D. H. NELSON:
A sensitive biologic assay for ACTH
Endocrinology 71, 13 (1962)

24. MARSCHNER, I., H. DOBRY, F. ERHARDT, T. LANDERSDORFER, B. POPP, C. RINGEL and P. C. SCRIBA:
Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels Spline-Funktionen
Ärztl.Lab. 20, 184 (1974)

25. MARSCHNER, I., F. W. ERHARDT and P. C. SCRIBA:
Calculation of the radioimmunoassay standard curve by "spline function"
In: Radioimmunoassay and related Procedures in Medicine, Vol. 1, p.111.
Proceedings, Symposium Istanbul, Intern. Atomic Energy, Vienna (1974)

26. MATSUKURA, S., C. D. WEST, Y. ICKIKAWA, W. JULBIZ, G. HARADA and F. H. TYLER:
A new phenomenon of usefulness in the radioimmunoassay of plasma adrenocorticotropic hormone
J. Lab. Clin.Med. 77, 490-500 (1971)

27. MATSUYAMA, H., A. RUHMANN-WENNHOLLD and D. H. NELSON:
Biologic and immunologic similarities between rat and human adrenocorticotropin
Endocrinology 87, 756 (1970)

28. MEAKIN, J. W., W. H. TINGEY jr. and D.H.NELSON:
The catabolism of adrenocorticotropic hormone. The stability of adrenocortocotropic hormone in blood, plasma, serum and saline
Endocrinolgy 66, 59 (1960)

29. MIRSKY, I. A., G. PERISUTTI and N. C. DAVIS:
The destruction of glucagon, adrenocorticotropin and somatotropin by human blood plasma
J. Clin. Invest. 38, 14 (1959)

30. MÜLLER, O. A., X. BAUR, I. MARSCHNER, P. SCHWANDT, P. C. SCRIBA and P. WEISWEILER: ACTH bioassay with isolated rat adrenal cells: ACTH activity of the porcine lipotropic peptide B.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 184, 164 (1974)

31. MUNSON, P. L.:
Adrenocorticotropic hormone.
In: Hormones in Human Plasma.
Ed.: H. N. Antoniades, Liddle, Brown and Company, Boston (1960)

32. NAHRS, P. W., M. STAHL, M. DAMBACHER, J. BAUMANN and J. GIRARD:
On the use of a peptidase inhibitor (Trasylol) for storage of J^{125}-labelled peptide hormones
Experimentia 28, 213 (1972)

33. NELSON, D. H., H. MATSUYAMA and A. RUHMANN-WENNHOLD:
Adrenal - in vivo
In: Methods in Investigate and Diagnostic Endocrinology. Vol. 2 A.
Eds.: S. A. Berson and R. S. Yalow, North-Holland Publishing Company - Amsterdam - London; American Elsevier Publishing Company, Inc. - New York (1973), p. 336

34. NELSON, D. H., H. MATSUYAMA and A. RUHMANN-WENNHOLD:
Adrenal Vein steroids
In: Methods in Investigate and Diagnostic Endocrinology. Vol. 2 A.
Eds.: S. A. Berson and R. S. Yalow, North-Holland Publishing Company - Amsterdam - London; American Elsevier Publishing Company, Inc. - New York (1973), p. 367

35. ORTH, D. N., D. P. ISLAND, W. E. NICHOLSON, K. ABE and J. P. WOODHAM:
ACTH-radioimmunoassay:
Interpretation, comparison with bioassay and clinical application: In "Radioisotopes in Medicine: In Vitro Studies" (R. C. Hayes, F. A. Goswitz, and B. E. P. Murphy, eds.), pp.251-272, U.S.Atomic Energy Commission, Div. of Techn. Information, Oak Ridge, Tennessee (1968)

36. ORTH, D. N.:
Adrenocorticotropic Hormon and Melanocyte Stimulating Hormone (ACTH and MSH)
In: Methode of Hormone Radioimmunoassay, Eds.: B. M. Jaffe and H. R. Behrman
Academic Press, New York and London 1974

37. PALMIERI, G. M. A., R. S. YALOW and S. A. BERSON:
Adsorbent techniques for the separation of antibody-bound from free peptide hormones in Radioimmunoassay.
Horm. Metab. Res. 3, 301 (1971)

38. PFEIFFER, E. F., G. GARMENDIA, E. VAUBEL and K. RETIENE:
Exogene and endogene ACTH-Aktivitäten im nativen Plasma des Menschen
Erg. Inn. Med., N. F. 20, 127 (1963)

39. PINCUS, G., T. F. HOPKINS and O. HECHTER:
An ACTH-inactivating factor in mammalian blood
Arch. Biochem. 37, 408 (1952)

40. RATCLIFF, J. G., and C. R. W. EDWARDS:
The extraction of adrenocorticotrophin and arginine-vasopressin from human plasma by porous glass
In: Radioimmunoassay Methods.
Eds.: K. E. Kirckham and W. M. Hunter, Edinburgh, Churchill Livingstone (1971) p. 502

41. ROSSELIN, G., R. ASSAN, R. S. YALOW and S. A. BERSON:
Separation of antibody-bound peptide hormones labelled with iodine-131 by talcum powder and precipitated silica
Nature 212, 355 (1966)

42. RUF, K.:
Bestimmungsmethoden für ACTH beim Menschen
Schweiz. Med. Wschr. 96, 684 (1966)

43. SAYERS, M. A., G. SAYERS and L. A. WOODBURG:
The assay of adrenocaticoticotropic hormone by the adrenal acid depletion method
Endocrinology 42, 379 (1948)

44. SAYERS, G., R. L. SWALLOW and N. D. GIORDANO:
An improved technique for the preparation of isolated rat adrenal cells:
A sensitive, acurate and specific method for the assay of ACTH
Endocrinology 88, 1063 (1971)

45. SAYERS, G. and N. D. GIORDANO:
Adrenal ascorbic acid depletion and isolated rat adrenal cell methods.
In: Methods in Investigate and Diagnostic Endocrinology. Vol. 2 A.
Eds.: S. A. Berson and R. S. Yalow,
North-Holland-Publishing Company - Amsterdam - London; American Elsevier Publishing Company Inc. - New York (1973)
p. 359

46. SAYERS, G.:
Adrenocorticotrophin
In: Hormones in Blood
Eds.: C. H. Gray and A. Bacharach
New York and London, Academic Press (1961)
p. 185

47. SCRIBA, P. C., R. HACKER, P. DIETERLE, F. KLUGE, W. HOCHHÄUSER and K. SCHWARZ: ACTH-Bestimmungen im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis Klin. Wschr. 44, 1393 (1966)

48. SELA, M.: Antigenicity: Some molecular aspects Science 166; 1365-1374; 1969

49. SKOWSKY, W. R. and D. A. FISHER: The use of thyroglobulin to induce Antigenicity to small molecules. Journal of Laboratory and Clinical medicine, Vol. 80, No 1, pp 134-144, July 1972

50. SOFRONIEW, M. V., M. MADLER, O. A. MÜLLER and P. C. SCRIBA: A method for the consistent production of high quality antisera to small peptide hormones Fresenius, Z. Anal. Chem. 290 (1978),163

51. SPIRO, M. J.: Studies on the protein portion of thyroblobulin J. Biol. Chem. 245: 5820-5826, 1970

52. UI, N., O. TARUTANI, Y. KONDO et al.: Chromatographic fractionation of thyroglobulin Nature 191: 1199-1201, 1961

53. VAIKUKAITIS, J., J. B. ROBBINS, E. NIESCHLAG, and G. T. ROSS: J. Clin. Endocrin. Metab. 33, 988 (1971)

54. VOIGT, K. H., H. L. FEHM and E. F. PFEIFFER: Production of antibodies to ACTH for use in radioimmunoassay Horm. Metab. Res. 3, 313 (1971)

55. WEIGLE, W. O., G. J. HIGH and R. M. NAKAMURA:
The role of myobacteria and the effect of proteolytic degradation of thyroglobulin on the production of autoimmune thyroiditis
J. Exp. Med. 130 : 243 - 262, 1969

56. WERDER, K. von:
Serumproteinbildung von Adrenocorticotropin. Ein Beitrag zum Problem der Bestimmung von ACTH-Plasma-Spiegeln
Diessertation, 1968 (63)

57. WERDER, K. von, K. SCHWARZ und P. C. SCRIBA:
Serumproteinbindung von ACTH
I. Untersuchungen mit Dextrangelfiltration und ^{3}H-ACTH
Klin. Wschr. 46, 940 (1968)

58. WERDER, K. von, K. SCHWARZ und P. C. SCRIBA:
Serumproteinbindung von ACTH
II. Untersuchungen mit Dichtegradienten. zentrifugation und ^{3}H-ACTH
Klin. Wschr. 46, 1028 (1968)

59. WERDER, K. von, F. KLUGE, K. SCHWARZ und P. C. SCRIBA:
Determination of serum protein binding of ^{3}H-ACTH using dextran gel filtration and density gradient centrifugation
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 119, 182 (1967)

60. WHITE, W. F. and A. M. GROSS:
J. Amer.Chem.Soc. 79, 1141 (1957)

61. WILLIAMS, W. L., D. ISLAND, R. A. A. OLDFIELD jr and G. W. LIDDLE:
Blood corticotropin (ACTH) levels in Cushing's disease
J. Clin. Endocr. 21, 426 (1961)

62. YALOW, R. S. and S. A. BERSON:
Characteristics of "Big ACTH" in human plasma and pituitary extracts
J. Clin. Endocr. Metab. 36, 415 (1973)

63. YALOW, R. S. and S. A. BERSON:
Topics on radioimmunoassay of peptide hormones
In: Protein and Polypeptide-Hormones
Ed.: M. Margoulies, Excerpt. Medica Foundation, Intern. Congress Series 161, Amsterdam-New York-London-Paris-Milano-Tokyo-Buenos Aires (1968)

64. YALOW, R. S. and S. A. BERSON:
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960)

65. YALOW, R. S. and S. A. BERSON:
ACTH-Measurement - Radioimmunoassay
In: Methods in Investigate and Diagnostic Endocrinology
Eds.: S. A. Berson and R. S. Yalow, North-Holland-Publishing Company - American Elsevier Publishing Company Inc. New York (1973)

66. YALOW, R. S. and S. A. BERSON:
Plasma ACTH in man
In: Radioimmunoassay, Hospital Medicine Publications Limited (1971)

7. LEBENSLAUF

Als zweites Kind des Tierarztes Adolf Madler und der Ärztin Dr. med. Liane Madler, geb. Hübner, wurde ich am 31. März 1953 in Eggenfelden/Niederbayern geboren. Von 1959 - 1963 besuchte ich die Volksschule in Falkenberg, ab Herbst 1963 das humanistische Gymnasium in Pfarrkirchen, das ich im Sommer 1972 mit dem Abitur beendete.

Seit dem Wintersemester 1972/73 studiere ich an der Universität München Medizin. Im August 1974 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im August 1975 den 1. Teil der Ärztlichen Prüfung und im August 1977 den 2. Teil der Ärztlichen Prüfung.

Von Herbst 1975 bis Frühjahr 1977 arbeitete ich im Labor für experimentelle Endokrinologie der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München an dieser Dissertation.